

# **DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS: ESTUDO DA DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *LEGIONELLA* OBTIDOS EM PORTUGAL, 1987-2016**

**MARIA DE JESUS FERNANDES CHASQUEIRA**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Vida  
na Especialidade em Medicina Celular e Molecular (Microbiologia)  
na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas**

**Maio, 2017**



# **DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS: ESTUDO DA DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *LEGIONELLA* OBTIDOS EM PORTUGAL, 1987-2016**

**Maria de Jesus Fernandes Chasqueira**

**Orientadora: Maria Teresa Marques**

**Professora Associada, sem Agregação  
(aposentada)**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Vida  
na Especialidade em Medicina Celular e Molecular (Microbiologia)**

**Maio, 2017**



Dedico esta tese à Mafalda e ao Miguel



Ao amor que me deu forças para continuar

À amizade que me amparou e manteve no rumo





## Agradecimentos

Escrever uma tese de doutoramento poderá ser uma missão solitária, mas como em tudo na vida é, da interação com os que nos rodeiam na nossa esfera pessoal e profissional que conseguimos realizar e concluir tão árdua tarefa. Para todos os que, de alguma maneira, me apoiaram neste longo percurso, deixo nestas páginas o meu mais sincero agradecimento.

À Professora Teresa Marques, minha orientadora, que desde a minha vinda para o Departamento de Microbiologia da FCM me incentivou a realizar este projeto e durante os anos que mediarão a decisão de me candidatar e a data em que, finalmente, concluí a escrita da presente tese, manteve a confiança na minha capacidade. A minha gratidão pela transmissão de conhecimentos, pelas facilidades concedidas para a realização dos diferentes estágios, cursos e por muitas outras oportunidades que me permitiram evoluir desde os “glóbulos vermelhos” até ao presente. Pela relação profissional e pessoal que fomos desenvolvendo nestes últimos 17 anos de convivência, pelos bons e maus momentos nas reuniões do EWGLI e pelos muitos outros momentos que tive a felicidade de partilhar, esta longa travessia valeu a pena. Sem o seu carinho e apoio não estaria agora a finalizar mais um capítulo da minha vida.

À minha eterna companheira de jornada, a Lúcia, que desde as longas noites a contar nucleótidos para enviarmos os resultados dos painéis do SBT e até ao dia de hoje, esteve sempre ao meu lado a motivar-me, a ajudar-me, a fazer tudo o que era preciso para que este projeto chegasse a este ponto final. Terminei como comecei... muito teria ficado por fazer se não fosse o teu companheirismo, ajuda e apoio.

Às minhas orientadoras de estágios sem as quais tinha sido quase impossível a realização deste trabalho:

- Monique Reyrolle, que no *Centre National de Référence*, em Lyon, me ajudou na minha incursão ao mundo da tipificação. A sua alegria, boa disposição e disponibilidade para me ensinar, foram preciosas e facilitaram a minha entrada no “mundo” da *Legionella*;

- Camen Pelaz, que me recebeu de braços abertos no *Instituto de Salud Carlos III*, em Madrid, onde com a sua paixão pela epidemiologia e objetividade para ultrapassar as dificuldades, na altura as do AFLP, me contagiou e deu forças para continuar. À Bea, obrigado pelos ensinamentos sobre o AFLP e companheirismo durante o meu tempo de permanência em Madrid;

- Carmen Buchrieser, que na *Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires*, no Instituto Pasteur, em Paris, permitiu, num primeiro estágio sedimentar conhecimentos sobre os ensaios de co-cultura *Legionella-Acanthamoeba* e, posteriormente proporcionou a realização de uma parte importante deste trabalho, os *microarrays*. A forma afável como me tratou e me integrou na sua multifacetada equipa foi essencial para a concretização do trabalho desenvolvido no terceiro capítulo. Obrigado ao Tobias por todos os ensinamentos e dicas sobre o ARN, a transcrição e a PCR-TR.

Ao João Paulo Gomes, do Núcleo de Bioinformática da Unidade de Investigação do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA, pela sua disponibilidade e apoio para a realização da WGS, assim como ao Vitor Gomes pela preciosa colaboração no tratamento e análise dos dados. O empenho de ambos foi essencial para a concretização do sonho de aplicar esta metodologia aos isolados do HospA, uma importante parte do presente trabalho.

À Teresa Baptista Fernandes, que me “passou” os seus conhecimentos sobre a cultura de células e pela disponibilidade em apoiar na fase de instalação do Laboratório de Cultura de Células no Departamento de Microbiologia da FCM.

À Marta, pela amizade com que me integrou no Laboratório de Microbiologia do HSC e me ajudou na montagem da técnica dos MABs e pelo apoio na fenotipagem de alguns dos isolados.

À Catarina Cunha, pelo trabalho desenvolvido no desenho e seleção dos *primers*, que foi essencial e pela maneira simpática como passou pelo nosso laboratório.

À Catarina Martins pelo apoio na citometria de fluxo e pela paciência para a aquisição das amostras.

À Isabel Faria, pela preciosa ajuda na subcultura e fenotipagem dos isolados dos últimos três anos do Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da DL.

À Dra Elsa, pela disponibilização das informações sobre os isolados dos últimos três anos.

À Augusta, a nova “aquisição” da nossa Unidade, pela boa vontade em ajudar em tudo o que lhe foi possível, e foram muitas as electroforeses neste último ano, sem ti como teria sido? Afinal vieste na altura certa...

À amizade de muitas pessoas desta instituição sem as quais todo o percurso teria sido mais difícil:

- Dra. Sónia, obrigado pelo apoio na parte académica, o carinho disponibilizado foi essencial e encorajador para algumas etapas do meu percurso;

- Dra. Dora, o “anjo da guarda” que me foi lembrando datas importantes;

- Dra. Odete, pelo carinho e disponibilidade para me ajudar a resolver algumas questões burocráticas que, por vezes, surgiram e por ela foram rapidamente solucionadas;

- D. Lucília, pela prontidão na resolução de alguns requisitos processuais na aquisição de bens e serviços;

- D. Teresa Cepeda, pelo seu apoio em muitos processos formais que me ajudou a ultrapassar.

À D. Olívia, D. Mariana, D. Regina, D. Luísa e à D. Lucrecia, ao carinho e amizade que me dispensaram e à atenção que tiveram com o material, foi importante para o bom funcionamento do Laboratório, dados os poucos recursos disponíveis.

Aos alunos de Mestrado deste ano (Diana, Eneida, Sérgio), pelo carinho e compreensão pela minha ausência na co-orientação.

À Ana, Mena, Sandra e todos os outros amigas/(os) pelo apoio e ausência compreendida.

E por último, aos meus PAIS, muito importantes para a concretização deste trabalho, com o seu carinho, preocupação e disponibilidade total ajudaram a manter o conforto no núcleo familiar, em especial dos netos.

Aos meus filhos, Mafalda e Miguel, pela compreensão das minhas ausências nestes últimos tempos, a mamã vai voltar em breve.

Ao Paulo, pela força, estímulo para continuar, apoio à família e por preencheres a minha vida.

A todos BEM-HAJAM

## Resumo

O trabalho desenvolvido dividiu-se em duas áreas do conhecimento do género *Legionella*: a epidemiologia e a interação bactéria-hospedeiro natural.

Estudou-se a epidemiologia da Doença dos Legionários em Portugal, no período entre 1987 e 2016, analisando 205 isolados, 178 dos quais recuperados de doentes com formas graves de pneumonia e 27 de amostras ambientais. Entre os isolados clínicos, 130 foram enviados através do Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários e 48 foram recuperados num hospital da área de Lisboa, com vários casos de infeção hospitalar durante 21 anos e em cuja água do sistema de distribuição foi sistematicamente isolada a bactéria.

Na tipificação destes isolados, utilizaram-se duas metodologias preconizadas pelo Grupo Europeu, anticorpos monoclonais (MAbs) do Painel de Dresden e a tipificação baseada em sequências (SBT). No grupo dos isolados provenientes de casos de infeção hospitalar foram aplicados mais dois métodos, o que avalia os polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP) e a sequenciação total do genoma (WGS).

Os resultados da tipificação mostraram que todos os isolados pertencem à espécie *Legionella pneumophila* e maioritariamente ao serogrupo 1, e que todos, à exceção de um, reagem com o monoclonal MAb3/1. Na tipificação baseada em sequências, identificaram-se 39 perfis diferentes, 16 dos quais são novos, isto é, nunca antes identificados.

Na sequenciação total do genoma, dos 48 isolados provenientes de infeção hospitalar, foi possível agrupá-los num mesmo clone, com uma microevolução marcada essencialmente pela fixação de mutações pontuais. Entre os isolados foi possível identificar três sub-linhagens, com base no número de diferenças nucleotídicas.

A caracterização feita diretamente nas amostras clínicas por uma técnica de *nested* PCR permitiu a identificação de alguns alelos, verificando-se que só em amostras provenientes de sobrenadantes de culturas de amibas foi detetado o perfil alélico completo.

Foi ainda efetuado o estudo da relação filogenética entre os perfis alélicos identificados em Portugal e os reportados à Base de dados Europeia por outros países. A população de *Legionella* responsável por casos de doença em Portugal é constituída por uma mistura de perfis específicos (exclusivos de Portugal) e de perfis comuns a outros países, tendo-se verificado nesta avaliação que 34 dos perfis têm relação com, pelo menos, um perfil dos existentes na referida Base.

Na segunda parte desta tese, desenvolveu-se o estudo da interação *Legionella*-hospedeiro natural, tendo-se utilizado a espécie *Acanthamoeba castellanii*. Avaliaram-se as taxas de internalização e multiplicação às 4, 14 e 22h, a sensibilidade ao sódio e ao choque osmótico com potássio, e ainda, o transcrito da bactéria, 22 horas após o início da co-cultura. Os resultados mostraram especificidade em relação às duas estirpes utilizadas e, embora estas

apresentem neste momento do seu ciclo de vida um fenótipo característico de fase transmissível, verificou-se que o padrão de expressão génica é semelhante ao evidenciado por outras estirpes, na fase replicativa, sugerindo que a *Legionella* na fase final do seu ciclo de multiplicação intracelular, já está a preparar a próxima fase replicativa.

## Abstract

The work developed was divided into two different areas of knowledge of the genus *Legionella*: epidemiology and natural bacterial-host interaction.

The epidemiology of Legionnaires' disease was studied in Portugal between 1987 and 2016, analyzing 205 isolates, 178 of which recovered from patients with severe forms of disease and 27 from environmental samples. Among the clinical isolates, 130 were sent by the Program of Integrated Epidemiological Surveillance of Legionnaires' Disease and 48 were recovered in a hospital in the Lisbon area, with several cases of hospital infection for 21 years, and with systematic isolation over the years in the water of the distribution system.

For typing of these isolates, two methodologies recommended by the European Group, the monoclonal antibodies (MAbs) of the Dresden Panel and the sequence-based typing (SBT) were used. In the group of isolates from cases of hospital infection, two other methods were applied, amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and whole genome sequencing (WGS).

The typing results showed that all isolates belong to the species *Legionella pneumophila* and mainly to serogroup 1, and all but one reacts with the monoclonal MAb3/1. In sequence-based typing (SBT), 39 different profiles were identified, 16 of which were new profiles, therefore never previously identified.

In the whole genome sequencing, of the 48 isolates from hospital infection, it was possible to group them in the same clone, with a microevolution marked essentially by the fixation of point mutations. Among the isolates, it was possible to identify three sub-lineages, based on the number of nucleotide differences.

The direct characterization on clinical samples by a nested PCR technique allowed the identification of some alleles, and it was verified that only in samples from supernatants of amoeba cultures the complete allelic profile was detected.

It was also carried out the study of the phylogenetic relationship between the allelic profiles identified in Portugal and those reported to the European Database by other countries. The population of *Legionella* responsible for cases of disease in Portugal consists of a mixture of specific profiles (exclusive of Portugal) plus profiles common to other countries, and it was verified in this evaluation that 34 of the profiles have relation with at least one profile of the European Database.

In the second part of this thesis, the study of the interaction *Legionella*-natural host was developed, using the species *Acanthamoeba castellanii*. The rates of internalization and multiplication were evaluated at 4, 14 and 22h, sensitivity to sodium, osmotic shock with potassium, and bacterial transcriptome, 22 hours after the start of co-culture. The results showed specificity in relation to the two strains used, and although they presented a transmissible phenotype, it was verified that the pattern of gene expression is similar to that evidenced by

strains in the replicative phase, suggesting that *Legionella* at the final phase of its intracellular multiplication cycle is already preparing the next replicative phase.

## Preâmbulo

A presente tese é resultado de um trabalho de investigação desenvolvido no Departamento de “Microbiologia e Parasitologia” da NMS|FCM da UNL, atualmente designado por Unidade curricular de “Infeção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas”, e teve como principais objetivos aprofundar os conhecimentos sobre a epidemiologia da Doença dos Legionários (DL) em Portugal e sobre a interação que as bactérias do género *Legionella* estabelecem com alguns protozoários.

A tese é constituída por quatro capítulos. O primeiro, de introdução geral ao género *Legionella*. O segundo, onde se caracteriza a população de *Legionella* que provocou DL em Portugal, entre 1987 e 2016. O terceiro que aborda os estudos realizados sobre a interação entre *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) e *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) seu hospedeiro natural. O quarto e último é dedicado às conclusões finais referentes ao trabalho de investigação desenvolvido.

No capítulo de introdução geral pretende-se enquadrar o tema escolhido, abordando de uma forma genérica as principais características do género *Legionella*, o seu ciclo de vida e a epidemiologia da doença que provoca, destacando os surtos que tiveram mais impacto a nível mundial, atendendo ao número de doentes envolvidos. Considera-se igualmente pertinente apresentar na introdução, a clínica associada à infeção por estas bactérias, os métodos de diagnóstico laboratorial e de terapêutica atualmente disponíveis, dado que as amostras utilizadas no presente trabalho foram recolhidas em Portugal, em doentes com quadro clínico de DL. Por último, é dada ênfase aos métodos de tipificação aplicados em vigilância epidemiológica, com especial realce para os que são utilizados na caracterização dos isolados da espécie *L. pneumophila*.

O segundo capítulo é dedicado à tipificação dos isolados de *L. pneumophila* recuperados em Portugal em doentes com quadros de DL, entre 1987 e 2016, utilizando as metodologias preconizadas pelo EWGLI (MAbs do painel de Dresden e SBT). Os resultados obtidos permitiram caracterizar a população de *L. pneumophila* circulante em Portugal, identificando a diversidade fenotípica e genotípica das estirpes que em Portugal provocaram infeções graves e conhecidas, no período em análise. Durante o estudo, foi igualmente possível investigar a relação evolutiva entre as estirpes identificadas em Portugal e entre estas e as reportadas à base de dados do EWGLI, isoladas noutros países. Numa subamostra, foi avaliado o poder discriminante de três métodos de tipificação (MAbs do painel de Dresden, AFLP e SBT). Foram ainda analisados os isolados ambientais e clínicos recolhidos ao longo de 26 anos num hospital

da área de Lisboa, tendo sido aplicados neste estudo quatro métodos diferentes de tipificação (MAbs do painel de Dresden, AFLP, SBT e WGS).

No terceiro capítulo, dedicado ao estudo da interação *Legionella* e *Acanthamoeba*, são apresentados os resultados dos ensaios que avaliaram a capacidade invasiva de três estirpes de *L. pneumophila*, genotipicamente diferentes, em *A. castellanii*. É discutido se a diversidade genética influencia a entrada e a multiplicação da *L. pneumophila* na ameba. São também apresentados os resultados do estudo das alterações induzidas no transcrito da *L. pneumophila* após co-cultura em *A. castellanii*, utilizando uma técnica de *microarrays* com confirmação de alguns genes por PCR em tempo real. O ensaio de *microarrays* foi realizado por nós, no *Institut Pasteur de Paris*, na *Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires* (UBBI).

No último capítulo, descrevem-se as conclusões gerais, as quais pretendem resumir e articular os principais resultados obtidos nas diferentes vertentes do presente trabalho. A contribuição da tese é contextualizada no conhecimento atual da epidemiologia da DL e da relação que a *Legionella* mantém com alguns protozoários, seu hospedeiro natural.



## Publicações

### Artigos Publicados em Revistas de Circulação Internacional com Arbitragem Científica:

**Chasqueira MJ**, Rodrigues L, Nascimento M, Ramos M, Marques T. Genetic diversity and evolutionary relationships among *Legionella pneumophila* clinical isolates, Portugal, 1987 to 2012. Euro Surveill. 2014 Nov 20; 19(46). pii: 20965.

**Chasqueira MJ**, Rodrigues L, Nascimento M, Marques T. Sequence-based and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* isolated from patients in Portugal during 1987-2008. Euro Surveill. 2009 Jul 16; 14(28). pii: 19271.

### Artigo Submetido em Revista de Circulação Internacional com Arbitragem Científica:

**Chasqueira MJ**, Paixão P, Rodrigues L, Piedade C, Caires I, Palmeiro T, Botelho A, Santos M, Curran M, Guiomar R, Papoila A, Alves M, N. Neuparth N. Respiratory infections in elderly people: viral role in a resident population of nursing homes in Lisbon, winter 2013-2014. Submetido para publicação: International Journal of Infectious Diseases.

### Artigo em Preparação para Submissão em Revista de Circulação Internacional com Arbitragem Científica:

**Chasqueira MJ**, Rodrigues L, Nascimento M, Costa J, Gonçalves E, Toscano C, Marques T, Paixão P. Recurrence of Legionnaires Disease at a Hospital in Lisbon over a 26-Year Period.



## Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

**A. castellanii** - *Acanthamoeba castellanii*

**AC2012** – Amostras ambientais recuperadas num surto da Comunidade em 2012

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico

**ADNc** – Ácido Desoxirribonucleico complementar

**ARNr** - Ácido Ribonucleico Ribossómico

**ARNm** - Ácido Ribonucleico

**AFLP** – do inglês: Amplified Fragment Length polymorphism

**AnkB** - do inglês: Ankyrin B

**AP-PCR** – do inglês: arbitrary primed PCR

**Asd** - do inglês: Aspartate -  $\beta$  semialdehyde dehydrogenase

**AVAC** – Aquecimento, Ventilação e Ar Condicionado

**AYE** - do inglês: ACES Yeast Extract

**BCYE- $\alpha$**  - do inglês: Buffered charcoal yeast extract enriquecido com  $\alpha$ -cetoglutarato

**BMPA** – Meio de BCYE suplementado com cefamandol, polimixina B, anisomicina

**BD-EWGLI/STB** – Base de dados do EWGLI-STB

**bp** – do inglês: base pair

**CAW** - Coeficiente Ajustado de Wallace

**°C** – Graus Celsius

**CC** – Complexo Clonal

**CDC** – do inglês: Centers for Disease Control and Prevention

**CDSC** – do inglês: Communicable Disease Surveillance Centre

**CE** - Comissão Europeia

**CFSE** – do inglês: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

**CI** - Intervalo de Confiança

**CIDSC** – do inglês: Centre of Infectious Disease Surveillance and Control

**cm<sup>2</sup>** – Centímetros quadrados

**CNE** - Centro Nacional de Epidemiologia

**CRISPR** - do inglês: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

**C<sub>T</sub>** – do inglês: threshold cycle

**C<sub>v</sub>** – Coeficiente de variação

**Cy** – Cianina

**DDO** – Doença de Declaração Obrigatória

**DGS** - Direção Geral da Saúde

**DL** – Doença dos Legionários

**DLAH** – Doença dos Legionários Adquirida no Hospital

**DLVs** – do inglês: Double *Locus* Variants

**dNTPs** – do inglês: Deoxyribonucleotide Triphosphates

**DNase** - Desoxirribonuclease

**DO** – Densidade Ótica

**Dot/icm** – do inglês: Dot: defective in organelle trafficking; icm: intracellular multiplication

**E** – Concordância epidemiológica

**ECDC** – do inglês: European Centre for Disease Prevention and Control

**ELDSNet** –do inglês: European Legionnaires' Disease Surveillance Network

**ELISA** –do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**EnhC** - do inglês: Enhanced entry protein

**ESCMID** - Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases

**ESGLI** - ESCMID Study Group for Legionella Infections

**EUL** – do inglês: European Union Legionella

**EWGLI** – do inglês: European Working Group for Legionella Infections

**EWGLINet** –do inglês: EWGLI Surveillance network

**fAFLP** – do inglês: fluorescent AFLP

**FITC** – do inglês: Fluorescein Isothiocyanate

**FlaA** - do inglês: Flagellin A

**FTIR** –do inglês: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

**GVPC** – Meio de BCYE suplementado com glicina, vancomicina, polimixina B e cicloheximide

**g** – Força centrífuga

**G** – Calibre da agulha

**h** – hora

**HGT** – do inglês: horizontal gene transfer

**HospA** – Hospital na área de Lisboa onde foram detetados vários casos de DL de origem hospitalar

**HospB** - Hospital da região norte onde foram detetados casos de DL de origem hospitalar

**HPA** – do inglês: Health Protection Agency

**HSC** - Hospital de Santa Cruz

**Hsp60** – do inglês: Heat shock protein

**ICT** –do inglês: Immunochromatographic Test

**IDS** - Índice de Diversidade de Simpson

**IgG, IgM, IgA** – Imunoglobulinas G, M e A

**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**InVS** – do francês: Institut de Veille Sanitaire

**IRS PCR** – do inglês: Interspersed Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction

**KCl** – Cloreto de potássio

**Km** - Quilómetro

**LAMP** –do inglês: Loop mediated isothermal amplification

**LCV** – do inglês: *Legionella* -containing vacuole

***L. pneumophila*** – *Legionella pneumophila*

***LpP*** – *Legionella pneumophila* estirpe Paris

**Ln** – Logaritmo natural

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**Lvh** – do inglês: *Legionella vir* homologues

**MAbs** – do inglês: Monoclonal Antibodies

**MALDI-TOF MS** – do inglês: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry

**MLST** – do inglês: Multilocus Sequence Typing

***mip*** – do inglês: Macrophage infectivity potentiator

**MIF** – do ingles: Mature Intracellular Form

**min** - minuto

**mL** – mililitro

**MLEE** – do inglês: Multilocus Enzyme Electrophoresis

**MLVA** - Do inglês: Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis

**MMCC** – Meio Mínimo para Co-Cultura

**MOI** – do inglês: Multiplicity of Infection

**MompS** - do inglês: Major outer membrane protein

**MWY** – do inglês: Modified Wadowski-Yee (Meio de BCYE suplementado com glicina, vancomicina, polimixina B e anisomicina)

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NeuA** - do inglês: N-acylneuraminate cytidyltransferase

**NeuAh** - do inglês: N-acylneuraminate cytidyltransferase homolog

**ng** - nanogramas

**NGS** – do inglês: Next-Generation Sequencing

**NotI** – enzima de restrição extraída de *Nocardia otitidis-caviarum* (ATCC 14630)

**NPSBT** – do inglês: nested-PCR-based SBT

**NUTS** - Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PBS** – do inglês: Phosphate Buffered Saline  
**PCR** – do inglês: Polymerase Chain Reaction  
**PCR-TR** – PCR em tempo real  
**PFGE** – do inglês: Pulse Field Gel Electrophoresis  
**PHE** – do inglês: Public Health England  
**PilE** - do inglês: Type IV pilin  
**PilD** - do inglês: Pre-pseudopilin peptidase  
**PKH67** – do inglês: Paul Karl Horan  
**ppGpp** - Guanosina 3',5'- bispirofosfato  
**pmol** – picomoles  
**ProA** – do inglês: Zinc metalloprotease  
**PVig Ep In da DL** - Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários  
**PYG** – do inglês: Peptone Yeast extract Glucose

**RAPD** - do inglês: Random Amplified Polymorphic DNA  
**REA** – do inglês: Restriction Enzyme Analysis  
**RelA** - Guanosina trifosfato pirofosfoquinase  
**REP-PCR** – do inglês: Repetitive Sequencing – Based PCR  
**RFLP** - do inglês: Restriction Fragment Length Polymorphism  
**rnpB** - do inglês: ribonuclease P RNA  
**rpoB** – do inglês  $\beta$  subunit of RNA polymerase  
**RNase** – do inglês: Ribonuclease  
**R<sub>NaCl</sub>** – Resistente ao sódio  
**R<sub>KC</sub>** – Osmoticamente Resistente  
**rpm** – rotações por minuto

**SBT** – do inglês: Sequence-Based Typing  
**SDS-PAGE** – do inglês: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
**SDAH** - Sistema de Distribuição de Água do Hospital  
**SfiI** – endonucleases de restrição extraída de *Streptomyces fimbriatus* (ATCC 15051).  
**Sg** - Serogrupo  
**SLST** – do inglês: Single-Locus Sequence Typing  
**SLVs** – do inglês: Single *Locus* Variants  
**SNPs** – do inglês: Single Nucleotide Polymorphisms  
**ST** – do inglês: Sequence Type

**TAC** – do inglês: TaqMan Array Card  
**TBE** – Tampão Tris/Borato/EDTA  
**TE** – Tampão Tris, 1M, pH 8.0  
**Tm** – do inglês: melting temperature  
**T4SS** – do inglês: Type IV secretion system

**UBBI** - Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires - Instituto Pasteur, Paris  
**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias  
**UG** – Unidade de Genoma  
**UPGMA** - do inglês: Weighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

**VIH** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**WGS** – do inglês: Whole Genome Sequencing

**μm** – micrómetro



## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Preâmbulo.....	vii
Publicações .....	ix
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas.....	xi
Índice.....	xv
Anexos.....	xix
Índice de figuras.....	xxi
Índice de tabelas.....	xxiii

## Capítulo 1 - Introdução

Género <i>Legionella</i> .....	1
1.2 História do surto de Filadélfia .....	2
1.3 Epidemiologia da Doença dos Legionários.....	3
1.3.1 Surto de Doença dos Legionários.....	5
1.3.2 Redes de vigilância epidemiológica da Doença dos Legionários.....	6
1.3.3 Doença dos Legionários e diversidade do género <i>Legionella</i> .....	9
1.4 Ciclo de vida da <i>Legionella</i> .....	11
1.5 Transmissão ao homem.....	13
1.6 Quadro clínico.....	14
1.7 Diagnóstico laboratorial .....	15
1.7.1 Critérios usados na definição de caso de Doença dos Legionários.....	21
1.8 Terapêutica.....	21
1.9 Métodos de tipificação para vigilância epidemiológica.....	22
1.9.1 Tipificação de isolados do género <i>Legionella</i> .....	24
1.9.1.1 Anticorpos monoclonais (MAbs).....	25
1.9.1.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	26
1.9.1.3 Polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP).....	27
1.9.1.4 Tipificação baseada em sequências (SBT) e algoritmos de análise.....	28
1.9.1.5 Sequenciação total do genoma (WGS).....	30
1.10 Estudos realizados em Portugal sobre <i>Legionella</i> e Doença dos Legionários.....	32
1.11 Objetivos do nosso trabalho experimental.....	35

## Capítulo 2 - Estudo da Epidemiologia da Doença dos Legionários em Portugal, 1987 – 2016

2.1 Material e métodos.....	37
2.1.1 Amostra em estudo.....	37

2.1.1.1 Isolados clínicos.....	37
2.1.1.2 Isolados ambientais.....	39
2.1.2. Tipificação dos isolados responsáveis por infeção humana em Portugal, 1991–2016.....	40
2.1.2.1 Anticorpos monoclonais (MAbs).....	40
2.1.2.2 Tipificação baseada em sequências (SBT).....	41
2.1.3 Tipificação dos isolados de um hospital da área de Lisboa, 1987-2012.....	43
2.1.3.1 Polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP).....	43
2.1.3.2 Sequenciação total do genoma (WGS).....	45
2.1.4 Tipificação diretamente de amostras clínicas.....	46
2.1.4.1 Método de nested-SBT.....	46
2.1.5 Análise dos dados.....	48
<b>2.2 Resultados.....</b>	<b>51</b>
2.2.1 Tipificação dos isolados responsáveis por infeção humana em Portugal, 1991 – 2016.....	52
2.2.1.1 Anticorpos monoclonais (MAbs).....	52
2.2.1.2 Tipificação baseada em sequências (SBT).....	52
2.2.1.3 Distribuição dos STs ao longo do período de estudo.....	54
2.2.1.4 Distribuição geográfica dos subgrupos (MAbs) e STs (SBT).....	55
2.2.1.5 Poder discriminante dos MAbs (painel de Dresden) e SBT.....	56
2.2.1.6 Relação entre subgrupos (MAbs) e STs (SBT).....	56
2.2.1.7 Relação entre STs (SBT) e subgrupos (MAbs).....	57
2.2.1.8 Tipificação de isolados ambientais recuperados no decurso de surtos.....	58
2.2.2 Tipificação dos isolados de um hospital da área de Lisboa, 1987 – 2012 .....	58
2.2.2.1 Anticorpos monoclonais (MAbs) e tipificação baseada em sequências (SBT).....	59
2.2.2.2 Polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP).....	61
2.2.2.3 Sequenciação total do genoma (WGS).....	63
2.2.3 Tipificação diretamente em amostras clínicas.....	69
2.2.4 Relação filogenética entre os STs identificados em isolados clínicos em Portugal, 1987-2016.....	69
2.2.5 Integração dos STs identificados em Portugal na epidemiologia geral da <i>L. pneumophila</i> .....	71
<b>2.3 Discussão.....</b>	<b>72</b>



### **Capítulo 3 - Interação *Legionella pneumophila* e *Acanthamoeba castellanii***

<b>3.1 Material e métodos</b>	<b>85</b>
3.1.1 Cultura <i>Legionella pneumophila</i> e <i>Acanthamoeba castellanii</i>	85
3.1.2 Ciclo de co-cultura <i>Legionella pneumophila</i> - <i>Acanthamoeba castellanii</i>	86
3.1.2.1 Primeiro ciclo de co-cultura	86
3.1.2.2 Segundo ciclo de co-cultura	87
3.1.3 Quantificação da <i>Legionella pneumophila</i> por inoculação em BCYE- $\alpha$	88
3.1.4 Quantificação de <i>Legionella pneumophila</i> por citometria de fluxo	89
3.1.5 Estudo da sensibilidade ao sódio	90
3.1.6 Estudo da sensibilidade osmótica	90
3.1.7 Avaliação do transcriptoma de <i>Legionella pneumophila</i> após co-cultura com <i>Acanthamoeba castellanii</i>	90
3.1.7.1 Avaliação por <i>microarrays</i>	91
3.1.7.2 Análise da expressão génica por PCR em tempo real	93
3.1.7.2.1 Seleção dos genes alvo. Desenho e seleção dos <i>primers</i>	93
3.1.7.2.2 Extração do ARN, tratamento com DNase e síntese do ADNc	94
3.1.7.2.3 Otimização do protocolo da PCR em tempo real	94
3.1.7.2.4 Estudo da especificidade analítica dos <i>primers</i>	95
3.1.7.2.5 Estudo da sensibilidade analítica dos <i>primers</i>	95
3.1.7.2.6 Estudo da reprodutibilidade do protocolo otimizado da PCR em tempo real	95
3.1.7.2.7 Estudo da linearidade e da eficiência do protocolo otimizado da PCR em tempo real	95
3.1.7.2.8 Cálculo da expressão génica por PCR em tempo real	96
3.1.8 Análise estatística	96
<b>3.2 Resultados</b>	<b>97</b>
3.2.1 Ciclo de co-cultura <i>Legionella pneumophila</i> e <i>Acanthamoeba castellanii</i>	97
3.2.2 Quantificação da <i>Legionella pneumophila</i> por inoculação em BCYE- $\alpha$	98
3.2.2.1 Primeiro ciclo de co-cultura Lp-Ac	98
3.2.2.1 Segundo ciclo de co-cultura Lp-Ac	99
3.2.3 Quantificação de <i>Legionella pneumophila</i> por citometria de fluxo	100
3.2.4 Estudo da sensibilidade ao sódio	101
3.2.5 Estudo da sensibilidade osmótica	101
3.2.6 Avaliação do transcriptoma por <i>microarrays</i> da <i>Legionella pneumophila</i> Paris após co-cultura com <i>Acanthamoeba castellanii</i>	102

3.2.7 Análise da expressão génica por PCR em tempo real.....	103
3.2.7.1 Seleção dos genes alvo, desenho e seleção dos <i>primers</i> .....	103
3.2.7.2 Otimização do protocolo da PCR em tempo real.....	104
3.2.7.3 Estudo da especificidade analítica dos <i>primers</i> .....	106
3.2.7.6 Estudo da sensibilidade analítica dos <i>primers</i> .....	108
3.2.7.7 Estudo da reprodutibilidade da PCR em tempo real.....	108
3.2.7.8 Estudo da linearidade e da eficiência da PCR em tempo real.....	110
3.2.7.9 Cálculo da expressão do ARNm por PCR em tempo real.....	110
3.2.7.10 Comparação dos resultados dos <i>microarray</i> e da PCR em tempo real.....	115
<b>3.3 Discussão.....</b>	<b>116</b>
 <b>Capítulo 4 – Conclusões gerais.....</b>	 <b>125</b>
 <b>Bibliografia.....</b>	 <b>129</b>

## **Anexos**

<b>I</b> - Distribuição dos isolados clínicos de <i>Lp</i> recolhidos em Portugal, 1987 - 2016, por ano, região e origem de aquisição da infeção, idade e género dos doentes, serogrupo e subgrupo (painel de Dresden) e ST.....	<b>153</b>
<b>II</b> – Variabilidade alélica dos sete <i>locus</i> do SBT nos isolados clínicos recolhidos em Portugal, 1991-2016.....	<b>157</b>
<b>III</b> – SNPs nos alelos mais representativos entre os isolados clínicos recolhidos em Portugal, 1991 – 2016.....	<b>159</b>
<b>IV</b> – Tipificação dos isolados recuperados no HospA, 1987 – 2012.....	<b>167</b>
<b>V</b> – Lista de estirpes da espécie <i>L. pneumophila</i> usadas na análise filogenética e <i>Zoom</i> da figura 22.....	<b>169</b>
<b>VI</b> - Tipificação dos isolados clínicos não relacionados pelo SBT, MABs e AFLP.....	<b>171</b>
<b>VII</b> – Relação filogenética entre os STs identificados em Portugal e os STs reportados à BD-EWGLI/SBT.....	<b>173</b>
<b>VIII</b> – Preparação de meios e soluções utilizadas durante o trabalho experimental.....	<b>177</b>
<b>IX</b> – Quantificação das UFC/mL obtidas nos ensaios de internalização e multiplicação intracelular, ensaios de sensibilidade ao sódio e de sensibilidade osmótica.....	<b>179</b>
<b>X</b> – Avaliação do transcriptoma por <i>microarrays</i> da <i>LpP</i> após co-cultura com <i>A. castellanii</i> .....	<b>183</b>
<b>XI</b> – Estudo da especificidade teórica dos <i>primers</i> .....	<b>191</b>
<b>XII</b> – Resultados da expressão génica relativa por PCR em tempo real.....	<b>193</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Aspeto dos bacilos de <i>Legionella</i> .....	2
<b>Figura 2</b> – Ciclo de vida da <i>Lp</i> em <i>Acanthamoeba</i> .....	2
<b>Figura 3</b> – Aspeto da cultura de <i>Legionella</i> em BCYEa.....	16
<b>Figura 4</b> - N° de casos notificados de DL, em Portugal, 1999 – 2016.....	34
<b>Figura 5</b> – Distribuição dos isolados clínicos pelo período em análise, 1987 a 2016, (n=178).....	38
<b>Figura 6</b> – Distribuição dos isolados clínicos pelas cinco NUTS de Portugal continental.....	38
<b>Figura 7</b> – Distribuição dos isolados clínicos quanto à origem da infeção.....	39
<b>Figura 8</b> – Distribuição dos isolados ambientais recuperados no período 1989 a 2012, (n=27).....	39
<b>Figura 9</b> - Esquema de tipificação utilizando o painel de Dresden.....	40
<b>Figura 10</b> – Algoritmo de tipificação utilizando os MAbs do painel Dresden.....	41
<b>Figura 11</b> – Algoritmo de tipificação utilizando o protocolo SBT.....	42
<b>Figura 12</b> – Algoritmo de tipificação utilizando o protocolo AFLP.....	44
<b>Figura 13</b> - Esquematização da tecnologia <i>Illumina</i> e esquema do alinhamento “de novo” <i>assembly</i> .....	45
<b>Figura 14</b> – Algoritmo da tipificação utilizando WGS (tecnologia <i>Illumina</i> ).....	46
<b>Figura 15</b> – Algoritmo de tipificação utilizando o protocolo nested-SBT.....	47
<b>Figura 16</b> – Distribuição dos STs pelo período de estudo.....	55
<b>Figura 17</b> – Distribuição dos STs pelas cinco NUTS de Portugal continental.....	55
<b>Figura 18</b> – Distribuição dos casos de DLAH de 1986 a 2012 no HospA (n=57).....	59
<b>Figura 19</b> – Distribuição ao longo dos anos dos STs associados às amostras clínicas e ambientais do HospA.....	60
<b>Figura 20</b> – Ensaio de reprodutibilidade do AFLP: quadro de resposta obtido numa das repetições em que não foi atribuído o AFLP tipo correto à estirpe EUL137.....	61
<b>Figura 21</b> – Eletroforese em gel agarose (1,5%) de cinco AFLP tipos diferentes.....	63
<b>Figura 22A</b> - Enquadramento filogenético da estirpe ST100 na diversidade genómica da espécie <i>L. pneumophila</i> .....	65
<b>Figura 22B</b> – Comparação com a estirpe Pt_VFX/2014 (ST1905).....	66
<b>Figura 23</b> - Filogenia e cronologia dos isolados ST100 associados no HospA.....	67
<b>Figura 24</b> . Microevolução dos isolados ST100 por data de recuperação.....	68
<b>Figura 25</b> – Relação filogenética dos STs identificados em isolados clínicos portugueses recuperados entre 1987 e 2016 (n=39).....	70
<b>Figura 26</b> - Matriz de distâncias entre os 39 STs gerada no <i>software</i> <i>PHYLOViZ</i> .....	71
<b>Figura 27</b> - Fluxograma de um ciclo de co-cultura <i>Lp-Ac</i> para os ensaios de internalização e multiplicação intracelular e análise da expressão génica.....	87

<b>Figura 28</b> - Fluxograma dos ensaios de co-cultura para a determinação da taxa de internalização e multiplicação intracelular: quantificação das UFC/mL.....	<b>88</b>
<b>Figura 29</b> – Fluxograma de recolha das amostras para o estudo da expressão génica de <i>LpP</i> após co-cultura <i>Lp-Ac</i> .....	<b>91</b>
<b>Figura 30</b> - Fluxograma de um ensaio de avaliação da expressão génica utilizando <i>microarrays</i> .....	<b>92</b>
<b>Figura 31</b> – Programa da PCR-TR utilizado no estudo da expressão génica de <i>LpP</i> .....	<b>94</b>
<b>Figura 32</b> – Morfologia da <i>A. castellanii</i> em meio PYE à temperatura ambiente.....	<b>97</b>
<b>Figura 33</b> – Morfologia durante ciclo de co-cultura <i>Lp-Ac</i> .....	<b>98</b>
<b>Figura 34</b> – Replicação intracelular em <i>A. castellanii</i> de três estirpes de <i>L. pneumophila</i> .....	<b>99</b>
<b>Figura 35</b> – Replicação intracelular de <i>LpP</i> no 1º ciclo de co-cultura e 2º ciclo de co-cultura...99	
<b>Figura 36</b> – Percentagem de resistência ao sódio da <i>LpP</i> em cultura líquida (fase exponencial e estacionária) e após co-cultura <i>Lp-Ac</i> (1º e 2 ciclo) .....	<b>101</b>
<b>Figura 37</b> – Percentagem de resistência osmótica da <i>LpP</i> em cultura líquida (fase exponencial e estacionária) e após co-cultura <i>Lp-Ac</i> (1º e 2 ciclo) .....	<b>101</b>
<b>Figura 38</b> – Distribuição dos genes que apresentam alterações após co-cultura <i>Lp-Ac</i> por categoria s funcionais.....	<b>102</b>
<b>Figura 39</b> – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de amplificação referentes aos 16 genes em estudo.....	<b>106</b>
<b>Figura 40</b> – Reavaliação dos <i>primers</i> lpp1170F+R, lpp1177F+R, lpp2694F+R.....	<b>108</b>
<b>Figura 41</b> – Regressão linear entre a variável Ct e Log <sub>10</sub> da concentração de ADN. Cálculo do coeficiente de correlação (R <sup>2</sup> ) e declive da reta para determinação do valor da eficiência.....	<b>110</b>
<b>Figura 42</b> – Valores da expressão génica da <i>L.pneumophila</i> na fase estacionária de uma cultura líquida.....	<b>112</b>
<b>Figura 43</b> - Valores da expressão génica da <i>L. pneumophila</i> após um 1º ciclo de co-cultura <i>Lp-Ac</i> .....	<b>113</b>
<b>Figura 44</b> - Valores da expressão génica da <i>L.pneumophila</i> após um 2º ciclo de co-cultura <i>Lp-Ac</i> .....	<b>114</b>

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1-</b> Identificação das zonas de análise em cada um dos <i>locus</i> estudados no esquema SBT	
<b>Tabela 2</b> – Identificação dos 16 AFLP tipo mais reportados à base de dados .....	<b>42</b>
<b>Tabela 3</b> – Variabilidade dos isolados clínicos de <i>L. pneumophila</i> , 1991 - 2016, aplicando os métodos de tipificação SBT e MAb (painel de Dresden) .....	<b>53</b>
<b>Tabela 4</b> - Distribuição dos isolados clínicos pelos alelos predominantes de cada um dos sete <i>locus</i> do SBT e respetivos SNPs .....	<b>56</b>
<b>Tabela 5</b> – Distribuição dos STs pelos subgrupos.....	<b>57</b>
<b>Tabela 6</b> – Distribuição dos isolados e subgrupos pelos STs.....	<b>57</b>
<b>Tabela 7</b> – Tipificação dos isolados ambientais recolhidos no contexto das investigações ambientais de dois surtos de pequenas dimensões .....	<b>58</b>
<b>Tabela 8</b> – Variabilidade dos isolados clínicos e dos isolados ambientais recolhidos no HospA, respetivamente, de casos de DLAH (1987-2007) e do SDAH (1989 – 2012) .....	<b>60</b>
<b>Tabela 9</b> – Resultados do ensaio de reprodutibilidade do AFLP com a estirpe EUL137 .....	<b>61</b>
<b>Tabela 10</b> – Ensaio de estabilidade do AFLP: interferência do nº de subculturas e do método de extração do ADN.....	<b>62</b>
<b>Tabela 11</b> – Variabilidade dos isolados clínicos e ambientais recuperados no HospA, segundo o método AFLP.....	<b>63</b>
<b>Tabela 12</b> - N <sup>os</sup> alélicos obtidos diretamente de amostras clínicas por <i>nested</i> -SBT.....	<b>69</b>
<b>Tabela 13</b> –STs BD-EWGLI/SBT que apresentam SLVs com o ST44 .....	<b>72</b>
<b>Tabela 14</b> – STs BD-EWGLI/SBT que apresentam SLVs com o ST100 .....	<b>72</b>
<b>Tabela 15</b> – STs BD-EWGLI/SBT que apresentam SLVs com o ST1905.....	<b>72</b>
<b>Tabela 16</b> – Número de gerações nas 22h de co-cultura <i>Lp</i> -Ac e tempo de duplicação para as estirpes <i>Lp</i> P, ST100 e ST1905.....	<b>98</b>
<b>Tabela 17</b> – Contagens de três suspensões de <i>Lp</i> P: no citómetro (BD FACSCalibur - BD Biosciences) utilizando os <i>BD Trucount</i> <sup>TM</sup> Tubes e inoculação em BCYE- $\alpha$ (antes e após marcação com CFSE).....	<b>100</b>
<b>Tabela 18</b> – Primers selecionados para a avaliação da expressão génica da <i>L pneumophila</i> por PCR-TR.....	<b>104</b>
<b>Tabela 19</b> – Resultados do ensaio de otimização da concentração dos primers.....	<b>105</b>
<b>Tabela 20</b> - Resultados do ensaio de otimização do volume de ADN.....	<b>105</b>
<b>Tabela 21</b> – Temperatura de <i>melting</i> específica de cada par de primers .....	<b>106</b>
<b>Tabela 22</b> – Resultados do estudo da especificidade analítica dos primers utilizando ADN <i>Lp</i> P e <i>A. Castellanii</i> .....	<b>107</b>
<b>Tabela 23</b> – Resultados do estudo da sensibilidade obtidos a partir de diluições sucessivas de ADN de <i>Lp</i> P.....	<b>108</b>
<b>Tabela 24</b> – Resultados do estudo da reprodutibilidade inter-ensaio e intra-ensaio utilizando ADN <i>Lp</i> P.....	<b>109</b>
<b>Tabela 25</b> – Comparação dos resultados da expressão génica de duas estirpes de <i>L. pneumophila</i> (ST1 e ST100) após 1º ciclo de co-cultura <i>Lp</i> -Ac utilizando <i>microarrays</i> e PCR-TR.....	<b>115</b>





# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1. Género *Legionella*

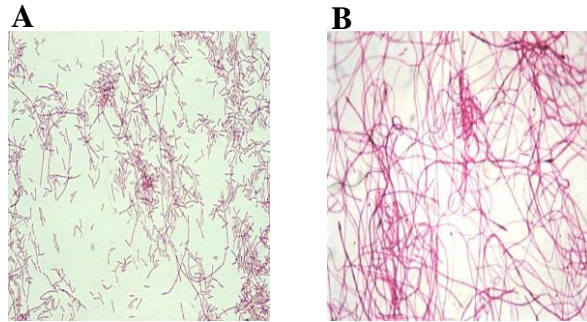
A bactéria *Legionella* (designação genérica para as bactérias do género *Legionella*) é ubíqua em ambientes aquáticos de água doce, estando largamente disseminada em rios, lagoas, lagos, solos húmidos, lama (59, 90) e em reservatórios artificiais de água criados pelo homem, nomeadamente, torres de arrefecimento industrial e sistemas AVAC (95; 108; 264), banheiras de hidromassagem (149), sistemas de irrigação (53, 173), fontes decorativas (130, 224, 268), águas hidrotermais (42, 298) e em muitos outros sistemas ou reservatórios de água doce (293). Esta bactéria é capaz de sobreviver nestes ambientes húmidos por longos períodos de tempo e pode resistir a temperaturas entre 0 e 68 °C e a pH de 5,0 a 8,5 (59, 298).

No meio ambiente, a bactéria multiplica-se intracelularmente em diversos tipos de protozoários (170,249), sendo esta relação fulcral para a sua ecologia. O hospedeiro proporciona-lhe um nicho adequado para a replicação, fornece nutrientes e proteção contra as condições adversas do meio ambiente (9, 278). Vários estudos têm demonstrado que após crescimento no interior de protozoários a bactéria apresenta maior resistência aos biocidas (8), antibióticos (10), ácidos e ao *stress* osmótico e térmico (220).

O conhecimento da bactéria é relativamente recente, tendo o género *Legionella* sido estabelecido em 1979 por Brenner, na sequência do estudo de um surto de pneumonia grave entre os participantes da 58ª Convenção da Legião Americana, em Filadélfia, em 1976. O agente etiológico responsável pela epidemia, inicialmente desconhecido, foi posteriormente designado por *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) e a doença causada, por Doença dos Legionários (LD) (21, 94, 197).

A família *Legionellaceae* pertence ao subgrupo gama das proteobactérias e é constituída por um único género (*Legionella*) subdividido em 60 espécies conhecidas e mais de 70 serogrupos (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>). Mas só 24 espécies foram até agora associadas a doença no homem (220), sendo a espécie *L. pneumophila* a mais frequentemente implicada (90%) e o serogrupo 1 (sg1) o mais prevalente (84%). Outras espécies mais frequentemente associadas a casos de doença (2 a 7%) são *L. bozemanai*, *L. micdadei* e *L. longbeachae* (220).

*Legionella* é um bacilo de Gram negativo com 0,3 a 0,9 µm de largura e 2 a 20 µm de comprimento (Figura 1); este pleomorfismo é influenciado pela temperatura, disponibilidade de nutrientes e crescimento no interior de amibas ou em meio de cultura (59, 205). As bactérias deste género são móveis devido à existência de um ou mais flagelos polares ou subpolares (248), com exceção de 3 espécies: *L. israelensis*, *L. longbeachae* sg1 e *L. oakridgensis* (137).



**Figura 1** – Aspeto dos bacilos de *Legionella* A) Cultura com incubação de 48h a 37°C (coloração pelo método de Gram, 1000x), B) Cultura com incubação de 10 dias a 37°C, (coloração pelo método de Gram, 1000x). (Fotos retiradas de 195)

## 1.2. História do surto de Filadélfia

A investigação do surto que ocorreu no hotel Bellevue Stratford, em Filadelfia, durante a 58ª convenção da Legião Americana, em Julho de 1976, revelou-se desde o início uma tarefa complicada para a equipa dos CDC.

A 2 de Agosto, os CDC foram alertados para a ocorrência de vários casos graves de pneumonia, sendo que no período de uma hora o número de participantes falecidos aumentara de 4 para 11 (97). No início, pensou-se que a causa seria uma nova estirpe do vírus Influenza, mas as análises não o confirmavam e a situação piorava a cada dia que passava. O número de mortes não parava de aumentar e os casos de doença não estavam a ocorrer só entre os hóspedes do hotel, incluíam também um condutor de autocarro e vários transeuntes (142, 205, 305).

Os métodos de diagnóstico conhecidos na altura (cultura, serologia, coloração de tecidos e toxicologia) não identificavam a causa da doença, sendo negativos todos os exames efetuados. Para os investigadores dos CDC, para além dos problemas de ordem técnica, havia ainda a pressão exercida pelos jornalistas, ávidos de notícias, bem como lidar com as memórias de uma recente epidemia de gripe que não tinha sido bem resolvida (97, 142, 305).

No decurso da investigação a equipa dos CDC concluiu que os maiores fatores de risco para adquirir a doença seriam idade avançada, sexo masculino, tabagismo e o tempo de permanência no *hall* do hotel ou na rua em frente. Beber água no hotel foi considerado um fator de risco moderado e não parecia haver nenhuma associação com a ingestão de alimentos, gelo ou a presença numa sala de conferências específica. Não parecia também existir evidência de transmissão pessoa a pessoa (97).

No total, registaram-se 182 casos de pneumonia dos quais 147 foram internados e 29 faleceram. A taxa de ataque total para delegados na convenção foi de 6,8% (198, 225, 280, 281).

A identificação do agente responsável pelo surto veio a acontecer em Janeiro de 1977, devido à persistência de McDade, que cansado dos comentários sobre a incapacidade da equipa de investigação para resolver este surto, voltou a examinar as lâminas com cortes de fígado, recolhidos das cobaias que tinham sido inoculadas com material dos doentes e coradas com

Giemsa. O investigador observou então imagens de microrganismos e em vez de os considerar contaminantes, como antes acontecera, tentou isolá-los como se fossem rickettsias. Paralelamente efetuou testes de imunofluorescência direta e indireta com amostras de soro recolhidas destes doentes. Os resultados obtidos permitiram concluir que os microrganismos então observados correspondiam ao agente responsável pelo surto (97, 197, 305). Mais tarde, através de estudos retrospectivos, ficou a saber-se que a bactéria já tinha sido responsável por outros surtos de pneumonia de etiologia desconhecida que tinham ocorrido entre 1947 e 1974 (198, 225, 280, 281).

### **1.3 Epidemiologia da Doença dos Legionários**

A DL tem uma distribuição mundial mas na maioria dos países, a doença é subdiagnosticada e subnotificada por razões que se prendem com a falta de informação, de meios de diagnóstico e/ou de um adequado sistema de vigilância epidemiológica. Deste modo, os dados conhecidos estão subestimados e não são verdadeiramente comparáveis entre países, pelo que a incidência global da doença é difícil de quantificar e os dados disponíveis devem ser interpretados com cuidado (47, 117, 205).

Nos EUA, desde o surto de Filadélfia que a incidência da doença não pára de aumentar, verificando-se que de 2000 a 2011, aumentou 249%, passando de uma incidência de 0,4 a 1,4 casos por 100 000 habitantes (66). Na Europa verifica-se a mesma tendência, comparando o número de casos notificados em 2009 e 2010, verifica-se um acréscimo de 13% (13). Nos anos seguintes o número de notificações enviadas ao ELSDNet pelos 28 países membros da EU, a Islândia e a Noruega, situou-se em média nos 1,1 por 100 000 habitantes. Neste período, a Eslovénia foi o país que apresentou a incidência mais elevada, teve em média 3,1 casos de DL por 100 000 habitantes (77, 78, 79, 80, 84). Em 2014, ano em que ocorreu o surto em Vila Franca de Xira, o número de notificações na Europa foi o mais elevado de sempre, 1,4 por 100 000 habitantes. Em 2015, o número manteve-se, e as taxas de notificação variaram de 0,0 (Bulgária, Polónia e Roménia) a 5,1 (Eslovénia) por 100 000 habitantes (84).

De 2010 a 2015, a maioria dos casos ( $\approx 80\%$ ) foi reportado por seis países, França, Itália, Espanha, Alemanha, Holanda e Reino Unido, verificando-se que os países de leste são os que reportam menos casos (77, 78, 79, 80, 81, 84). Em Portugal, entre 2004 e 2013, a incidência foi de 0,9 casos por 100 000 habitantes, tendo sido notificados, nesse período, 962 casos (DGS, 2014). Estes números foram ultrapassados em 2014, devido sobretudo ao surto que ocorreu na região de Vila Franca de Xira, onde foram identificados 403 casos de DL, 377 dos quais foram considerados como “casos confirmados” (112). Em 2016, os dados provisórios mostram um aumento do número de notificações. Foram reportados 198 casos que, à exceção do ano de 2014, ano do surto, é o valor mais elevado de notificações desde que o PVig Ep In da DL foi criado (DGS, dados não publicados).

Noutras regiões do globo a situação é idêntica, como por exemplo na Austrália, onde a taxa de notificação aumentou drasticamente de 1991 para 2000, passando de 0,6 para 2,5 casos por 100 000 habitantes (176). Em 2013, último ano com dados publicamente disponíveis, verificou-se uma taxa de 2,2 casos por 100 000 habitantes (219). Na Nova Zelândia, entre 1979 e 2009, a incidência média foi de 2,5 por 100 000 habitantes, considerando o número de casos diagnosticados (123). Em Singapura a taxa de incidência da DL é discriminada em dois grupos, os casos indígenas e os importados. No primeiro grupo, verificou-se uma diminuição na incidência de 1,4 casos por 100 000 habitantes em 2000 para 0,3 em 2009, mas no segundo deu-se o inverso, no período entre 2005 e 2010 apresentou um aumento de 25,3%, sendo a maioria dos casos importados de outros países asiáticos (169, 208).

Em Israel, no período de 2006 a 2011, a taxa de incidência variou entre 0,7 a 1 casos por 100 000 habitantes (215) e no Japão os dados de 2008 a 2012 indicam que a incidência atingiu em algumas regiões do país o valor de 1,2 por 100 000 habitantes (145).

No Canadá, de 1990 a 2005 a incidência permaneceu estável, 0,3 casos por 100 000 habitantes, mas a partir de 2006 aumentou atingindo em 2015 o valor de 1,9 casos por 100 000 habitantes (172).

Noutros países como África do Sul, Argentina, Brasil e México não existem dados oficiais, embora existam estudos que nos permitem afirmar que a bactéria também está presente (37, 131, 175, 190, 307).

A DL apresenta um padrão sazonal, com um pico de atividade que vai de junho a outubro, predomina no sexo masculino, mas é rara em crianças, ocorrendo a maioria dos casos em indivíduos com mais de 50 anos. Em 2014, 71% dos casos reportados na Europa pertenceram ao sexo masculino, sendo a proporção homem/mulher de 2,6 para 1; 80% tinham idade superior a 50 anos, estando a maioria incluída no grupo etário dos 52 aos 74 anos. Dos casos referenciados, 74% foram associados à comunidade, 18% a viagens e 7% a instituições de saúde (81).

Os casos de DL podem ocorrer sobre a forma de casos esporádicos ou de surtos, sendo que em ambos os casos a doença pode ser adquirida na comunidade ou estar associada à prestação de cuidados de saúde (47, 117, 205, 235). Analisando alguns relatórios, verifica-se que após a ocorrência de um surto, a taxa de notificação aumenta, especialmente se for um caso mediático pelo número de pessoas envolvidas, pelo local onde ocorreu ou pela situação invulgar que o originou. Este acontecimento parece passar a lembrar aos clínicos que, em caso de pneumonia, a *Legionella* deve ser equacionada como possível agente etiológico, o que leva à realização de testes específicos em maior número, aumentando assim o número de casos diagnosticados (221, 235, 270).

### 1.3.1 Surtos de Doença dos Legionários

A história da DL está repleta de surtos, sendo que estes acontecimentos têm-se revelado uma importante fonte de conhecimento sobre o género *Legionella*.

A maioria dos surtos tem origem na comunidade e está associado a torres de arrefecimento industrial e sistemas AVAC, embora muitos outros sistemas formadores de aerossóis tenham sido responsáveis por epidemias mais ou menos graves consoante a área de dispersão que atingem (53, 108, 131, 149, 222, 232, 264, 268, 288, 299, 309).

Como se soube mais tarde, o surto de 1976 não foi o primeiro. O surto mais antigo de que se tem conhecimento aconteceu em 1957, numa fábrica de carnes, em Austin, Minesota, envolvendo 78 trabalhadores (225). Em 1965, 81 doentes do hospital psiquiátrico St. Elizabeth em Washington desenvolveram pneumonia após o internamento, verificando-se 14 óbitos (281). Em 1974, dois anos antes do surto de Filadélfia que deu a conhecer a DL, 20 membros da *Independent Order of Odd Fellows* desenvolveram quadros de pneumonia após terem assistido a uma reunião no salão principal do hotel Bellevue Stratford, tendo falecido duas dessas pessoas (280). Pensa-se que a fonte de infeção destes surtos tenha sido as torres de arrefecimento do sistema de ar condicionado (surtos de 1957 e 1974) e o sistema de rega por aspersão que estava a ser reparado (surto de 1965).

De entre outros surtos conhecidos destacam-se, pelo elevado número de doentes envolvidos, dois surtos em Espanha, o de Múrcia em 2001 e o de Mançanares em 2015, e o surto que ocorreu em 2014, na região de Vila Franca de Xira, Portugal.

No surto de Múrcia, num período de 15 dias foram reportados 800 casos, 449 dos quais confirmados laboratorialmente, 74% dos doentes afetados tiveram necessidade de hospitalização. A taxa de óbitos foi baixa, 1.1%, e o estudo epidemiológico associou a infeção a uma torre de arrefecimento do sistema AVAC de um dos hospitais da cidade. Curiosamente durante o estudo epidemiológico deste surto descobriu-se um outro, com 11 casos de infeção, associado a outro hospital (108).

O surto de Mançanares, que se prolongou de 19 de novembro de 2015 a 4 janeiro de 2016, envolveu um total de 558 doentes, 278 casos confirmados, 26 prováveis e 254 que não se vieram a confirmar. A taxa de incidência foi de 14,9/1000 habitantes, a percentagem de hospitalização foi de 36% e a taxa de letalidade de 1,4% (ocorreram 4 mortes). O estudo epidemiológico identificou duas instalações como as mais prováveis fontes da infeção, uma fonte ornamental e uma torre de arrefecimento (232).

Em 2014, de 14 de outubro a 2 de dezembro, ocorreu na região de Vila Franca de Xira um surto que envolveu 403 casos de pneumonia, 377 casos confirmados, 26 casos prováveis, com 14 óbitos, correspondendo a uma taxa de letalidade de 3,5%. A distribuição dos casos mostra que o surto afetou 3 concelhos do distrito de Lisboa, Vila Franca de Xira, Loures e Lisboa, sendo o

primeiro concelho o que apresentou uma taxa de ataque mais elevada, 59,9 casos por 10 000 habitantes. Dos 377 casos confirmados, 366 necessitaram de cuidados hospitalares (112, 264).

A transmissão da *Legionella* terá ocorrido em resultado de uma conjugação de fatores, a presença de um foco infeccioso e as condições meteorológicas que nessa época do ano apresentaram um comportamento excecional com temperaturas médias superiores a 20°C, humidade relativa entre 80 e 90%, circulação de vento com velocidade reduzida de nordeste para sudoeste e uma concentração elevada de partículas na atmosfera provenientes do deserto do Saara.

Após a análise das águas recolhidas na rede de distribuição pública, captações privadas e torres de arrefecimento, a fonte de transmissão da infeção foi atribuída a uma das torres de arrefecimento de uma das quatro unidades fabris existentes no concelho de Vila Franca de Xira (112).

O mais recente alerta emitido pelo ECDC foi a 22 de Dezembro de 2016 e refere-se ao súbito aumento de casos de DL entre viajantes que regressaram, após 1 de Outubro, do Dubai. Dos 37 casos reportados, verificou-se um óbito, a maioria (n=17) foram notificados pelo reino Unido, os restantes foram pela Holanda, Suécia, Dinamarca, França e Bélgica. Estes turistas estiveram alojados em 22 locais diferentes do Dubai, no raio de 35 Km. Esta situação é preocupante dado que nos últimos cinco anos o número de turistas da EU que viajaram para o Dubai aumentou 47%. Uma vez que se desconhece se a incidência da doença entre os residentes aumentou e como ainda não foi identificada a fonte de contaminação, suspeita-se que esta possa estar em locais frequentemente visitados por turistas, por ex., aeroportos, centros comerciais ou atrações turísticas (82, 83).

### **1.3.2 Redes de vigilância epidemiológica da Doença dos Legionários**

A vigilância epidemiológica da DL tem como objetivo determinar a frequência, as tendências e as principais características epidemiológicas da doença, de modo a identificar e controlar precocemente surtos (205, 221, 235).

Ao longo dos anos têm sido implementados esquemas de vigilância na maioria dos países europeus, EUA, Austrália, Nova Zelândia, Singapura, Israel, Japão e Canada (235). Estas redes de vigilância têm como missão validar a informação recebida, caracterizar o caso, investigar se existem outros casos relacionados, identificar *clusters*, pesquisar o reservatório ambiental da bactéria que terá dado origem ao caso em estudo (fonte de infeção) e, se for um equipamento de utilização coletiva, implementar as medidas de controlo consideradas necessárias para interromper a disseminação (28, 221, 230).

Considera-se um *cluster* quando são detetados dois ou mais casos de DL associados à mesma fonte de infeção, tendo o início da sintomatologia ocorrido num período inferior ou igual a dois anos (62).

Nos EUA, de 2000 a 2011, a vigilância da DL foi efetuada de forma passiva, baseando-se na notificação de casos ao Sistema Nacional de Vigilância de Doenças Notificáveis (NNDSS), por prestadores de cuidados de saúde, laboratórios ou cidadãos. Para complementar este sistema na deteção de surtos e efetuar a vigilância dos casos relacionados com viagens foi criado o Sistema Complementar de Vigilância da Doença dos Legionários (SLDSS). Em 2011, o programa de Infecções Emergentes do CDC implementou um sistema ativo de vigilância, o *Active Bacterial Core Surveillance* (ABC). Foram instituídos 10 locais de captação de dados em regiões consideradas representativas da população do país, baseando-se o sistema na procura ativa dos casos de DL junto dos laboratórios, sendo a informação recolhida por pessoas treinadas. Embora o sistema só abranja uma fração da população dos EUA, as taxas de notificação obtidas foram semelhantes às identificadas pelo NNDSS, sugerindo que o ABC é representativo e os resultados obtidos podem ser generalizados a toda a população do país. Para além disso, como a informação é recolhida de uma forma padronizada e sistemática, é possível uma avaliação mais concreta do impacto da doença e assim, ajustar o esforço de prevenção da DL (33, 66).

Na Europa, a OMS iniciou em 1981 uma série de reuniões com especialistas de *Legionella*, nas áreas da microbiologia e da epidemiologia, oriundos de 12 países, com o objetivo de implementar uma rede europeia de vigilância da DL. Na sequência destas reuniões em 1986 foi criado o EWGLI (substituído em 2010 pelo ESGLI, grupo de trabalho do ESCMID) e um ano mais tarde, para realizar a vigilância da DL associada a viagens, foi instituída a EWGLINet. O EWGLI, inicialmente financiado pela OMS foi coordenado, até 1992, pelo Laboratório Nacional de Bacteriologia de Estocolmo. No entanto, após divergências sobre a eficácia do programa de vigilância implementado, a coordenação foi transferida para Londres, ficando o EWGLI na dependência da HPA e com financiamento da CE. O protocolo de vigilância foi então alterado, tendo-se adaptado um novo modelo de notificação e informatizado o processo.

A CE, em 1998, criou uma rede comunitária de vigilância epidemiológica e controlo das doenças de declaração obrigatória. Esta decisão concedeu um estatuto legal ao EWGLINET, passando as notificações a ser obrigatórias entre os estados membros da CE que aprovaram as diretrizes sobre prevenção, deteção e notificação dos casos de DL associados a viagens, propostas pelo EWGLI (159), que foi o caso de Portugal.

O sistema de vigilância instituído revelou-se eficaz e, por isso, quando se procedeu à junção de todos os sistemas de vigilância da Europa, este foi o último a ser transferido para o ECDC. A partir de 2010, o esquema de vigilância da DL passou a ser coordenado pelo ECDC, sendo agora a rede designada por ELDSNet

([http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires\\_disease/ELDSNet/Pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires_disease/ELDSNet/Pages/index.aspx)).

Na vigilância dos casos de DL associados a viagens, quando um caso de infeção é detetado num turista, o país visitado é notificado, tendo 2 semanas para preencher o primeiro formulário confirmando que foi efetuada uma avaliação do risco junto das unidades referenciadas no

inquérito epidemiológico e que foram iniciadas medidas de controlo. Após 4 semanas, deverá ser remetido ao ELDSNet outro formulário discriminando os resultados obtidos e quais as medidas de prevenção realizadas no decurso da investigação. Quando este procedimento é corretamente efetuado o processo é encerrado. No entanto, em caso de incumprimento, o nome da entidade hoteleira envolvida na transmissão da infeção é publicitado na página do ECDC ([http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires\\_disease/Pages/accommodation-site-list.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires_disease/Pages/accommodation-site-list.aspx)) e avisados os operadores turísticos. Ao longo dos anos, este procedimento condicionou positivamente as unidades hoteleiras a tomarem medidas de controlo e de prevenção para evitarem a colonização dos seus sistemas AVAC e de distribuição de água quente. Atualmente, as reservas *online* vieram alterar esta dinâmica, pelo que a rede terá que implementar outras opções para relançar a vigilância da DL.

De entre os países que implementaram um sistema de vigilância para a DL, a Inglaterra e o País de Gales são os que possuem a base de dados mais antiga do mundo. Em 1980, vários laboratórios públicos e hospitalares concordaram reportar ao centro de vigilância das doenças comunicáveis (CDSC), coordenado pelo PHE, de forma voluntária e numa base semanal, todos os casos de infeção por *Legionella* detetados (157). Atualmente, o centro de vigilância e controlo de doenças infecciosas (CIDSC) emite mensalmente no *site* (<https://www.gov.uk/government/publications/legionnaires-disease-monthly-surveillance-reports-2016>) um relatório com o número de casos de DL notificados nos dois países.

Em França, o país da Europa que mais casos de DL reporta ao ELDSNet, a notificação obrigatória iniciou-se em 1987. Os casos são reportados às agências regionais de saúde (ARS), entidades responsáveis pela realização do inquérito epidemiológico, sendo a monitorização a nível nacional efetuada pela autoridade nacional de saúde (InVS) após envio dos dados coligidos pelas ARS. Este esquema foi reforçado em 1997, em colaboração com o Centro Nacional de Referência para *Legionella* - Lyon, com a emissão de informações para os clínicos, de orientações para a prevenção e controlo da doença e alteração do formulário de notificação (27, 28).

Em Espanha, outro país com um histórico elevado de casos de DL, a doença passou a ser de declaração obrigatória em 1996 (240). Neste país, a vigilância epidemiológica centra-se na Rede Nacional de Vigilância, complementando-se com dados provenientes de outros sistemas e fontes de informação como o Centro Nacional de Microbiologia do Instituto de Saúde Carlos III.

Nas comunidades autónomas, as autoridades de saúde pública são responsáveis pela notificação dos casos, numa base semanal, ao Centro Nacional de Epidemiologia. Por sua vez esta entidade é responsável pela notificação ao Centro Coordenador de Alertas e Emergências de Saúde, do Ministério da Saúde, e ao ELDSnet. A vigilância foi reforçada em 2003, pelo Real Decreto



865/2003, de 4 de Julho, que estabelece os critérios de saúde e higiene para a prevenção e controle da DL (241).

Em Portugal, a DL é de notificação clínica obrigatória (DDO) desde 1999 (Portaria n.º 1071/98, de 31 de Dezembro). No entanto, dado que o número de casos reportados era diminuto, em 2004 foi introduzida a obrigatoriedade da notificação laboratorial. O Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários (PVig Ep In da DL), criado pela circular normativa n.º 5/DEP de 22/04/2004, é coordenado pela DGS e engloba na vigilância epidemiológica, para além das estruturas anteriormente envolvidas (clínicos, autoridades de saúde e DGS), todos os serviços de patologia clínica, públicos e privados, assim como o INSA, o laboratório de microbiologia do HSC (que mudou para o Hospital Egas Moniz em 2010) e o departamento de microbiologia da FCM-UNL (atualmente NMS|FCM-UNL) (62).

Com este reforço de vigilância pretendeu-se aumentar o número de casos notificados, e colmatar as falhas de informação das DDO com os dados obtidos pelo PVig Ep In da DL. Foi ainda estabelecido pela circular normativa n.º 6/DT de 22/04/2004 que após a notificação de um caso de DL é obrigatório completar, em tempo útil, o inquérito epidemiológico e o estudo ambiental (63).

Em Portugal, a vigilância epidemiológica das doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública foi reforçada pela Lei n.º 81/2009, de 21 de agosto e pelo Despacho da DGS n.º 5855/2014, de 5 de maio, respetivamente, com a instituição de um Sistema de Vigilância em Saúde Pública e com a obrigatoriedade de notificar através da aplicação informática de suporte ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica). Este sistema eletrónico de notificação está disponível on-line (<https://sinave.min-saude.pt>) e envolve todas as autoridades de saúde e outras entidades dos sectores público, privado e social. A notificação eletrónica passou a ser obrigatória a partir de janeiro de 2015, para todos os médicos (Despacho n.º 5855/2014 de 21 de abril, DGS) e partir de 1 de janeiro de 2017 para todos os laboratórios (Portaria n.º 22/2016 de 10 de fevereiro, DGS).

### 1.3.3 Doença dos Legionários e diversidade do género *Legionella*

Desde a sua identificação em 1977 que o número de espécies de *Legionella* tem vindo a aumentar, tendo sido até ao momento identificadas 60 espécies e mais de 70 serogrupos (<http://www.bacterio.net/legionella.html>). A classificação dentro da família *Legionellaceae* nem sempre foi consensual: Garrity e colaboradores dividiram-na em três géneros, *Legionella*, *Fluoribacter* e *Tatlockia*, de acordo com os valores de hibridização ADN-ADN (111), mas Brenner e colaboradores tinham opinião diferente e advogavam a existência de um género único (22). Os estudos realizados por Fry e colaboradores demonstraram que a família é monofilética, as sequências do gene 16S do ARNr de espécies representativas dos três géneros apresentaram um elevado grau de homologia (> 95%) confirmando assim, a divisão num só género (98).

Apesar da variedade dentro do género *Legionella*, os estudos que têm vindo a ser realizados mostram que a diversidade entre os isolados que causam infeção no homem é menor que a existente no meio ambiente (42, 43, 65, 129). Das diferentes espécies e serogrupos descritos até ao momento, *L. pneumophila* é a responsável pela maioria dos casos de doença, 84% a nível mundial e 95% na Europa (13, 89, 135). O sg1 predomina (79 a 96%), sendo que dos restantes serogrupos, o sg3 e sg6 são os que mais vezes estão associados à DL (65, 81, 135, 310). No entanto, verifica-se que *L. pneumophila* sg1 não é a mais abundante no ambiente, como por exemplo em França, onde é responsável por 95% das infeções mas só se encontra presente em 28% das amostras ambientais analisadas no CNR (65). No Reino Unido a situação é idêntica, 88% dos isolados de doentes com DL são *L. pneumophila* sg1, enquanto no ambiente só 43% dos isolados pertencem a este grupo (129). Estes dados sugerem que o número de casos de infeção não está relacionado com a abundância da espécie no meio ambiente mas com a sua virulência. Esta observação é ainda reforçada pelo facto de outras espécies muito frequentes no meio ambiente, *L. anisa*, *L. dumoffi* e *L. feeleii*, raramente infetarem o homem e os casos descritos serem de indivíduos sujeitos a terapêuticas imunossupressoras. É possível considerar que, com as condições adequadas, as pessoas imunocomprometidas possam infetar-se com qualquer espécie de *Legionella* (47, 166).

Em 1988, a espécie *L. pneumophila* foi subdividida em três subespécies – *L. pneumophila*, *L. fraseri* e *L. pascullei* (23). No entanto, esta subdivisão raramente é reportada, porque os laboratórios de rotina não possuem capacidade técnica para a testar (162).

As outras espécies mais vezes associadas à DL são *L. longbeachae*, *L. bozemanæ*, e *L. micdadei* (2 a 7%) (81, 220, 310). É importante não esquecer que os métodos de diagnóstico estão otimizados para a deteção da *L. pneumophila* e muito em particular para o sg1 desta espécie, pelo que os casos de DL por outras espécies estão provavelmente subdiagnosticados e por isso os números conhecidos estão sujeitos a um viés, como mostrou o estudo de Vaccaro e colaboradores (286).

Na Nova Zelândia e na Austrália a epidemiologia da DL tem um padrão diferente, com uma percentagem de casos provocados pela *L. longbeachae* idêntica à das infeções por *L. pneumophila* e em alguns anos até superior (48, 123, 146, 219, 306).

A espécie *L. longbeachae* foi descrita pela primeira vez em 1981 (199) e ao contrário da *L. pneumophila*, raramente é isolada de ambientes aquáticos, estando os casos de infeção humana associados à exposição a misturas de terras e outros materiais orgânicos em decomposição (cascas e restos de serragem) utilizados no envasamento de plantas. Um estudo efetuado por Steele e colaboradores, em 1990, mostrou que esta espécie pode sobreviver durante 7 meses nas misturas armazenadas à temperatura ambiente (272).

Nos últimos 10 anos, a incidência de infeções por esta bactéria tem vindo a aumentar na Europa, especialmente na Escócia (48, 236). A maioria dos casos ocorreu na primavera ou no verão e coincidiu com atividades de jardinagem.

A forma de transmissão da *L. longbeachae* permanece incerta, no entanto, a proximidade ou o contacto direto (mão/boca) com terra de envasamento tem sido sugerida como possível via de infeção. A má higiene das mãos após a jardinagem ou a prática de ingestão de alimentos durante os trabalhos foram considerados comportamentos de risco para contrair a DL (223). O facto de ainda não terem sido descritos surtos associados à disseminação desta espécie a longa distância, parece sugerir que não é transmitida por aerossóis como a *L. pneumophila* (306).

#### 1.4 Ciclo de vida da *Legionella*

A *Legionella* em meio de cultura apresenta um ciclo de vida bifásico alternando entre uma fase replicativa e uma fase transmissível. No meio ambiente a *Legionella* multiplica-se intracelularmente em diversos tipos de hospedeiros, incluindo numerosas espécies de amibas, protozoários ciliados e diferentes células como macrófagos e células epiteliais, no interior dos quais apresenta um ciclo de vida semelhante ao observado no meio de cultura.

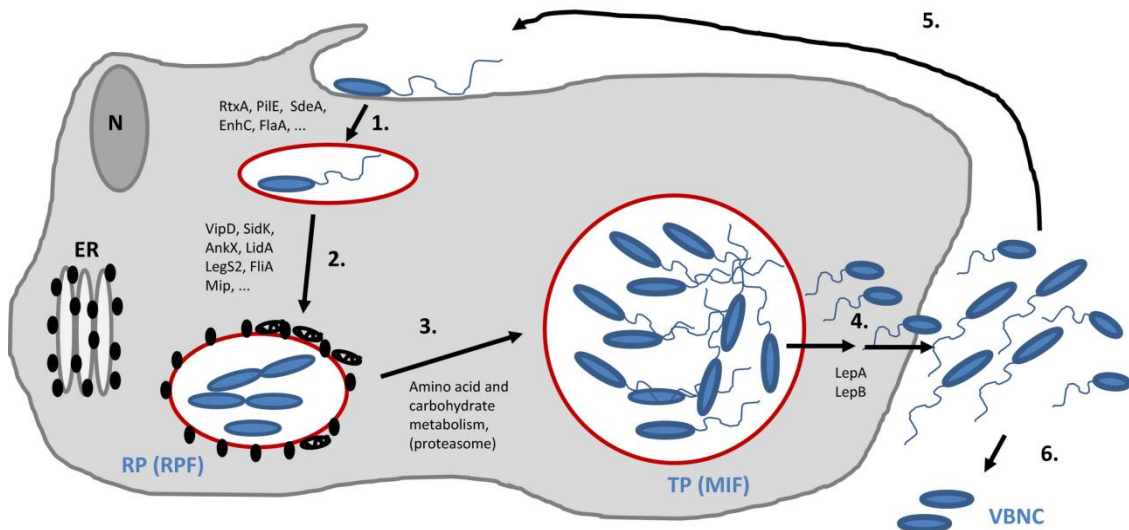
A relação com os protozoários é fulcral para a ecologia e patogénese da *Legionella*. Estes possibilitam a persistência da bactéria no meio ambiente, proporcionando-lhe um nicho adequado para a replicação, fornecendo nutrientes e proteção contra as condições adversas (170, 213, 249). A coevolução dos dois microrganismos e a transferência horizontal de genes (HGT) permite à bactéria a aquisição de genes eucariotas, que parece facilitar a adaptação da *L. pneumophila* à vida intracelular no macrófago humano e aumentar a sua capacidade para provocar doença (244).

Para que a interação com a célula hospedeira tenha sucesso, a bactéria precisa que as proteínas que lhe conferem virulência sejam transportadas através das membranas, interna e externa, para a sua superfície ou diretamente para o interior do hospedeiro. Na *L. pneumophila* os sistemas Sec e Tat asseguram a secreção através da membrana interna e os sistemas Lsp tipo II dependente de PilD, Icm/Dot tipo IVB e o Lvh tipo IVA, a secreção pela membrana externa. Estes sistemas para além do importante papel na virulência da bactéria são essenciais na colonização e estabelecimento dos biofilmes (24, 52).

O ciclo de vida da *L. pneumophila* é caracterizado por alterações profundas no transcrito que se traduzem em modificações fenotípicas significativas. Assim, de bacilo filamentosos, não flagelado, resistente ao sódio, com baixas capacidades citotóxicas e de resistência ao stress na fase replicativa, a bactéria passa na fase transmissível, a bacilo curto, flagelado e móvel, com capacidades citotóxicas e de resistência ao stress, mas sensível ao sódio (1, 244, 251, 275).

Após a ligação à superfície da célula hospedeira, a bactéria é incorporada pelo processo normal de fagocitose (3, 213) ou pela chamada *coiling phagocytosis*, processo pouco frequente que

consiste numa fagocitose assimétrica em que a bactéria é enrolada por pseudópodes (220, 247). As proteínas efetoras que a bactéria utiliza para entrar na célula hospedeira são o RtxA, PilE, EnhC, Momp, LadC, Lcl, Hsp60 e LaiA (SdeA). No caso específico de o hospedeiro ser a amíbia, só as duas primeiras parecem ser utilizadas (Figura2) (72, 74, 263).



**Figura 2** – Ciclo de vida da *L. pneumophila* em *Acanthamoeba*.

1. A bactéria adere à célula hospedeira sendo incorporada no seu interior por fagocitose ou *coiling phagocytosis* 2. Na fase seguinte a bactéria necessita de vários efetores T4BSS e outros fatores para estabelecer o LCV. Dentro do LCV *L. pneumophila* diferencia-se na forma replicativa (RPF) e inicia a replicação. 3. *L. pneumophila* recruta elementos celulares para revestir o LCV e ativa o proteossoma do hospedeiro. Quando os nutrientes são escassos a bactéria diferencia-se na forma transmissível (TP) sobre forma infecciosa (MIF). 4. A bactéria invade o citoplasma, termina o ciclo replicativo e evade-se do hospedeiro. 5 e 6 *L. pneumophila* inicia o ciclo num novo hospedeiro ou sobrevive no meio ambiente sobre uma forma viável mas não cultivável (VBNC) (adaptado de 72)

Após a fagocitose, a bactéria sobrevive injetando aproximadamente 300 proteínas efetoras para o citoplasma do hospedeiro, através do sistema de secreção Dot/Icm tipo IVB. Estas proteínas subvertem o normal tráfego celular do hospedeiro a favor da *Legionella*, modulando várias vias metabólicas e de sinalização da célula eucariótica. Os principais passos desta fase são o bloqueio à degradação microbiana, alteração das defesas do hospedeiro e a aquisição de nutrientes que permitam a sua replicação no interior deste (3, 72, 73, 141, 244, 263). Assim, as estirpes virulentas de *Legionella* após a fagocitose permanecem no LCV, o chamado vacúolo contendo de *Legionella*, recrutam mitocôndrias, ribossomas e pequenas vesículas derivadas do sistema retículoendotelial para o revestir e assim, evitar a fusão com o compartimento lisossomal e criar um local seguro para a replicação. As proteínas efetoras envolvidos nesta fase são o SidM/DrrA, RalF, LidA, SidC e AnkB. No caso de o hospedeiro ser a amíbia só as duas

últimas parecem ser utilizadas (Figura 2) (72, 74, 263). Nas estirpes não virulentas esta etapa não se verifica, pelo que a bactéria é degradada após fusão do LCV com o lisossoma.

Na fase de replicação quando os nutrientes escasseiam ocorre a ativação da RelA que promove a síntese da ppGpp, esta por sua vez, aciona a transcrição de vários genes que modulam a passagem para a fase transmissível (3, 72, 73, 141, 244).

Quando a *L. pneumophila* entra em fase transmissível, evade-se do LCV para o citoplasma, onde termina a modulação das características fenotípicas específicas desta fase, como por exemplo o flagelo e a capacidade citotóxica, após o que sai do hospedeiro e inicia novo ciclo de infecção.

Pensa-se que o processo de evasão seja constituído por três etapas, a lise da membrana do LCV, antecedida da formação de poros, a acumulação de bactéria no citoplasma, o que provoca uma perturbação funcional e estrutural dos organelos citoplasmáticos, e finalmente a desintegração da membrana do hospedeiro (Figura 2) (72, 211). A lise da membrana do hospedeiro pode ainda ocorrer por ação de enzimas com atividade citolítica, como a RtxA, a ProA ou outras fosfolipases (72, 214, 244). Outros autores apontam para a utilização de vesículas, os chamados MIFs (mature intracellular form), como estratégia da *L. pneumophila* para sair do protozoário (15, 19). Estas vesículas protegem a bactéria contra as condições adversas e parecem ter um papel importante na persistência no meio ambiente e na sua transmissão. Este processo, não lítico, parece ser mediado pela LepA e LepB (72).

Nos macrófagos a bactéria evade-se induzindo a apoptose via caspase-3. As caspases são proteases com um resíduo de cisteína que clivam proteínas logo a seguir aos resíduos aspartato. No caso da caspase-3, esta ativa a DNase, que degrada o ADN cromossomal promovendo desta forma a morte do hospedeiro. O sistema de secreção Dot/Icm tipo IV é essencial para a ativação deste processo (212).

### **1.5. Transmissão ao homem**

No ciclo de vida da *Legionella* o homem aparece como um hospedeiro acidental e final (205). A transmissão do ambiente para o homem ocorre por inalação de aerossóis infecciosos, provenientes sobretudo de reservatórios artificiais de água contaminados com a bactéria (47, 96) ou, no caso da espécie *L. longbeachae*, a partir dos compostos de adubos e terra utilizados no envasamento de plantas (223, 272). A aspiração de água contaminada com *Legionella* foi também sugerida como uma via de transmissão, no entanto a frequência com que ocorre não é clara (143, 254).

Pensou-se inicialmente que a transmissão acontecia pela inalação da bactéria na sua forma livre, mas vários autores têm vindo a afirmar que a transmissão se verifica pela inalação de vesículas - MIFs (109, 126, 201, 251). Esta teoria baseia-se na evidência de alguns hospedeiros naturais da *L. pneumophila* expelirem vesículas após fagocitarem a bactéria (15, 19, 110) e de estas

vesículas apresentarem um tamanho respirável (1-5µm de diâmetro) e na sua maioria conterem um número de bactérias (várias dezenas) considerado como possível dose infectante (15). A circunstância de nunca ter sido observada a formação de MIF nos macrófagos tem sido apontada como possível explicação para a não transmissão homem a homem. Esta hipótese de transmissão ganhou relevância após a notificação de um provável caso de transmissão inter-humana durante o surto que ocorreu, em 2014, em Vila Franca de Xira, Portugal (40)

### **1.6. Quadro clínico**

O quadro clínico das infecções por *Legionella* varia desde uma síndrome gripal ligeira, designada por Febre de Pontiac, a uma pneumonia grave, por vezes fatal, denominada Doença dos Legionários.

A Febre de Pontiac apresenta-se como uma infeção brônquica auto limitada, com febre, astenia, mialgias, artralgias, dor de cabeça, tosse, náuseas e dor de garganta. É mais comum em pessoas jovens, sendo estes casos geralmente identificados em contexto de surto, devido à natureza ligeira e inespecífica dos sintomas. Epidemiologicamente, caracteriza-se por períodos de incubação curtos (5 a 48 h) e os doentes recuperam sem tratamento específico, ao fim de 2 a 5 dias (115, 283).

A DL é uma pneumonia de evolução rápida e por vezes fatal, apresentando um período de incubação, em média, entre 2 a 10 dias, acompanhado de um quadro clínico que pode apresentar febre, mal-estar, mialgia, calafrios, alterações neurológicas, dor de cabeça e diarreia, geralmente seguidos por tosse seca e dispneia (47, 284). A doença afeta predominantemente o sexo masculino, ocorrendo a maioria dos casos em pessoas com mais de 50 anos. Têm suscetibilidade aumentada os indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crónica, hábitos tabágicos, diabetes, insuficiência renal, transplantados de órgãos sólidos, sob corticoterapia e com neoplasias do foro hematológico (59, 235). Na Europa, em 2014, o número de óbitos associados aos casos de DL foi de 10% (81). Em Portugal, no período entre 2004 e 2013, a proporção dos casos notificados de DL em que se verificou o óbito foi 5,9% (64). Estes valores são substancialmente mais elevados nos indivíduos que pertencem aos grupos com suscetibilidade aumentada.

As infeções extrapulmonares raramente ocorrem e os casos descritos estão geralmente associados a doentes imunocomprometidos. No entanto, a sua verdadeira frequência pode estar subestimada por falta de diagnóstico. Na literatura estão descritos, entre outros, casos de abscessos cutâneos, celulite necrosante, síndrome nefrótica e endocardite (39, 231). Pensa-se que estas infeções são consequência da disseminação hematogénea da bactéria a partir do pulmão (59, 217).

### 1.7. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da DL pode ser efetuado pelo isolamento do agente em cultura a partir de amostras respiratórias e tecidos, pela pesquisa direta de antígenos, por imunofluorescência em secreções respiratórias e tecidos, pela pesquisa de antígenos na urina, por ELISA ou imunocromatografia ou pela detecção do ADN. É ainda possível realizar a pesquisa de anticorpos no soro, por ELISA ou imunofluorescência indireta.

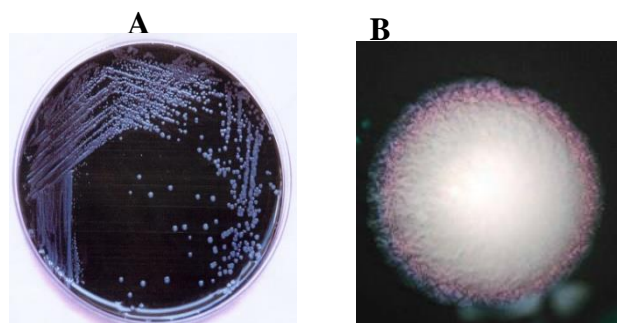
O diagnóstico microbiológico da DL foi inicialmente dificultado pela não existência de um meio de cultura adequado às exigências nutricionais da bactéria e suficientemente seletivo que permitisse o seu isolamento a partir de fluidos biológicos não estéreis (70). A utilização de um meio tamponado (pH 6,9) contendo cisteína, íons ferro, extrato de levedura (fonte de carbono, azoto e energia) e carvão ativado, aumentou a capacidade de recuperação da bactéria e o tamanho das colónias, facilitando o isolamento em cultura (69, 88, 140). A presença do carvão ativado no meio é essencial para a adsorção do peróxido de hidrogénio e dos radicais superóxido resultantes da foto-oxidação do extrato de levedura e da auto-oxidação da cisteína. Estes dois compostos inibem o crescimento da bactéria, dado que esta não possui catalase ou, nas espécies que a têm, esta parece não conferir tolerância ao peróxido de hidrogénio exógeno (140, 234, 246).

Por outro lado, a adição de antimicrobianos ao meio (polimixina B e vancomicina) veio potenciar a capacidade de recuperação da *Legionella* em amostras potencialmente contaminadas, isto é, colhidas em locais não estéreis (69).

O isolamento da *Legionella*, pelas razões anteriormente apontadas, não é possível utilizando os meios de cultura enriquecidos usados por rotina no laboratório microbiologia clínica. Associando este facto ao de o crescimento característico da bactéria ser fastidioso, ou seja, as colónias habitualmente só se desenvolverem ao fim de pelo menos 3 a 5 dias, é fulcral para o correto processamento das amostras que o laboratório seja informado da suspeita de DL. Só possuindo estas informações, é possível selecionar quais as amostras respiratórias que devem ser processadas diferencialmente para cultura de *Legionella* e mantidas a 37°C durante 10 dias, tempo necessário para que se possa considerar a cultura como negativa.

A cultura é o método de referência no diagnóstico da DL, pois permite o diagnóstico de todas as espécies, e a realização de estudos epidemiológicos. Apresenta uma especificidade de 100% e uma sensibilidade variável de 20 a 80% (47, 147). A composição do meio de cultura utilizado (BCYE- $\alpha$ , GVPC, BMPA ou MWY) é um fator crucial para a obtenção de isolados, principalmente em amostras respiratórias que apresentem baixo inóculo de *Legionella* e alto nível de contaminação (56). Outros requisitos importantes são a experiência do observador, para reconhecer as colónias de *Legionella*, aliada ao cuidado na observação das placas de cultura.

Perante o aparecimento de uma colônia com morfologia característica a olho nú e aspeto em “vidro moído” quando observada à lupa com ampliação de 40 (Figura 3), deve efetuar-se a confirmação através de aglutinação de colônias com partículas de latex revestidas com anticorpos específicos e pela verificação da necessidade nutricional em cisteína, demonstrada pela ausência de crescimento após subcultura em meio de BCYE- $\alpha$  sem cisteína ou em gelose de sangue (148).



**Figura 3** – Aspeto da cultura de *Legionella* em BCYE $\alpha$ , **A**) Cultura pura com 48h de incubação a 37°C. Colônias redondas, convexas, de bordos ligeiramente irregulares, com dimensões variáveis, entre 1 a 2 mm, translúcidas e superfície lisa e brilhante, **B**) Aspeto característico de “vidro moído” e tom anilado de uma colônia observada à lupa (40x). (Fotos retiradas de 195)

A pesquisa direta de antígenos em secreções respiratórias e tecidos, por imunofluorescência, tem como vantagens diminuir o tempo de resposta para 2 a 4h e possibilitar a utilização de amostras colhidas após o início da antibioterapia (218). O método deteta a espécie *L. pneumophila* e, dependendo do anticorpo usado e da experiência do observador, apresenta uma sensibilidade de 25 a 75% e uma especificidade de 95% (89), tendo sido descritas reações cruzadas com *Pseudomonas fluorescens*, *Bordetella pertussis* e *Bordetella bronchiseptica* (150). É um método atualmente pouco utilizado, <1% nos países europeus (81).

A pesquisa de antígenos na urina pode ser realizada por ELISA ou imunocromatografia (ICT) e permite um diagnóstico precoce e rápido das infeções provocadas por *L. pneumophila* sg1. O desenvolvimento do teste imunocromatográfico revolucionou o diagnóstico da DL, dado que possibilita um tempo de resposta curto (15 a 30 minutos) e a consequente instituição precoce de terapêutica. Williams e Lever demonstraram que o antígeno lipopolissacárido (LPS) era um componente da membrana externa da parede celular (304). Este componente começa a ser excretado 1 a 2 dias após o início dos sintomas, e pode permanecer, em média, até 2 meses após o início da antibioterapia (47, 59, 205).

A crescente utilização deste método no diagnóstico da DL deve-se, por um lado, ao bom desempenho dos testes atuais de ELISA e ICT, que apresentam uma especificidade de 95 a 100% e uma sensibilidade de 70 a 90%, dependendo da utilização ou não de urina concentrada (205), e por outro, à facilidade na obtenção da amostra, simplicidade na execução e rapidez da



resposta. Em 2014, 87% dos casos reportados à ELDSNet foram diagnosticados por este método (81).

Importa, no entanto, reter a ideia de que um resultado negativo na pesquisa de antígenos na urina não exclui a *Legionella* como possível agente etiológico responsável pelo quadro de pneumonia, sobretudo se pertencer a outro serogrupo que não sg1, e que um resultado positivo pode ser consequência de uma excreção prolongada e não significar infeção atual. No estudo efetuado pela equipa de Kohler foi detetado um doente com excreção até 172 dias após o início da terapêutica, e no estudo de Sopena e colaboradores, embora a maioria dos doentes (75%) tenha apresentado uma excreção até 60 dias, houve casos de excreção mais prolongada, tendo-se verificado que esses eram doentes imunodeprimidos (164, 269).

A pesquisa de anticorpos no soro, por ELISA ou imunofluorescência indireta, é outro método utilizado no diagnóstico da DL. Este método foi crucial na investigação do surto de Filadélfia, em 1976 e nos estudos retrospectivos de casos de pneumonia de etiologia desconhecida que ocorreram em anos anteriores (197, 225, 280, 281).

O método não permite efetuar o diagnóstico na fase aguda da doença, porque normalmente os anticorpos só aparecem 2 semanas após o início dos sintomas. Por outro lado, para se averiguar a seroconversão é necessário colher duas amostras com um intervalo de 2 a 3 semanas. Acresce que, em doentes com elevado grau de imunossupressão, pode não ocorrer produção de anticorpos (47). Como a resposta imunitária ao género *Legionella* é múltipla, incluindo uma mistura de IgG, IgM e em menor grau IgA, é necessário garantir que o teste utilizado reconhece estas 3 classes de imunoglobulinas.

A pesquisa de anticorpos no soro apresenta uma sensibilidade variável entre 41 e 94% (147). Sobre a sua especificidade, têm sido referidas reações cruzadas, com *Bacteroides* spp, *Pseudomonas* spp, *Haemophilus influenzae*, *Coxiella burnetti*, *Rickettsia* spp e *Campylobacter* spp, entre outros (89).

Os dados do ECDC mostram uma decrescente utilização do método, de 17% entre 2000 e 2002 (158), para 5% em 2014 (81).

Apesar de apresentar baixo impacto na decisão clínica, dado o intervalo de tempo necessário para obter um resultado conclusivo, o método tem provado ser de grande utilidade em estudos epidemiológicos e de prevalência geral da doença. Um exemplo foi o surto de 2005, na Noruega, onde inicialmente foram diagnósticos, por cultura, PCR e/ou pesquisa do antígeno na urina, 56 casos de DL. Mais tarde, num estudo retrospectivo que avaliou os níveis de anticorpos em todos os casos de pneumonia internados durante o período do surto, identificaram-se 47 novos casos de doença (265).

Os casos de Febre de Pontiac são normalmente identificados retrospectivamente utilizando esta metodologia, dado que os sintomas são ligeiros e semelhantes a uma síndrome gripal (122, 227).

A pesquisa de ADN por PCR, à semelhança da cultura, permite o diagnóstico de todas as espécies de *Legionella*, com a vantagem de ter resultados disponíveis em 24h, dependendo do fluxo de trabalho do laboratório. Este método tem ainda a vantagem de, ao invés da cultura, o resultado não ser influenciado pela viabilidade da bactéria, podendo, assim ser realizado após o início da antibioterapia.

O método apresenta uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 80 a 100%, sendo que, para a deteção da espécie *L. pneumophila*, o gene alvo escolhido tem sido o *mip*, e para a deteção do género *Legionella*, os mais utilizados têm sido os genes 5S ou 16S do ARNr (7, 59). No diagnóstico da DL por PCR têm sido usadas amostras respiratórias, urina e soro (38, 58, 294). A possibilidade de utilização de amostras não respiratórias é aliciente, uma vez que a maioria dos doentes com DL tem uma tosse não produtiva; no entanto, a sensibilidade tem sido baixa e com resultados contraditórios (202), tornando-se necessário aumentar o número de estudos para avaliar o seu potencial para o diagnóstico na fase aguda da doença.

Os maiores obstáculos para a implementação do método da PCR no diagnóstico da DL têm sido a falta de padronização, a dificuldade em interpretar os chamados “falsos-positivos” (38, 59), o aparecimento de *kits* de extração contaminados com a bactéria e a falta de controlos negativos (7, 290). Acrescenta-se a estes o facto de a DL ter baixa prevalência, o que dificulta a inclusão, nos estudos comparativos, de séries com um grande número de amostras positivas. Apesar de tudo isto, na Europa e nos últimos anos a proporção de diagnósticos efetuados com recurso à PCR tem vindo a aumentar sucessivamente, de menos de 2% em 2008 para 8% nos anos de 2014 (81).

A pesquisa simultânea de mais de um agente, por PCR multiplex, tem sido referida como uma mais-valia no caso dos microrganismos atípicos, causadores de pneumonia (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Legionella* spp) (180).

Por último, é importante referir que o diagnóstico da *Legionella* tem beneficiado com a aplicação de novas metodologias, destacando-se entre outras, a cultura em amibas, a LAMP, o *Taqman array cards* (TAC) e o MALDI-TOF MS.

A cultura de amostras respiratórias em amibas tem vindo a ser referida por alguns autores como um complemento aos métodos de diagnósticos convencionais (55, 148, 250).

A cultura em amibas permite a amplificação do inóculo, isto é, a multiplicação da bactéria, e a reativação de formas viáveis mas não cultiváveis (274). Assim, nos casos em que o número de bactérias na amostra é baixo, torna-se difícil detetar a *Legionella*, principalmente, se existir uma elevada contaminação com flora. Se efetuarmos uma co-cultura em amibas, como a quantidade de bactérias é amplificada, a sua visualização é facilitada através da coloração das amibas ou da sementeira do lisado obtido a partir da co-cultura, nos meios convencionais para a *Legionella*.

As espécies de amibas mais utilizadas têm sido *A. polyphaga* e *A. castellanii*, verificando-se que a taxa de recuperação de ambas é semelhante (55)

Este método de diagnóstico não tem sido muito utilizado, devido à sua principal desvantagem, a de exigir a manutenção de amibas em cultura, mas existem algumas equipas que têm vindo a utilizá-lo, embora de forma esporádica. Foi o caso de uma equipa francesa que efetuou um estudo durante 3 anos, apresentando esta técnica uma sensibilidade de 34%, contra uma sensibilidade de 42% da cultura convencional. No entanto, a primeira conseguiu recuperar *Legionella* em 12 amostras muito contaminadas com flora da orofaringe, que tinham sido negativas na cultura convencional. Quando os dois métodos foram utilizados em paralelo, a sensibilidade combinada aumentou para 47%. Estes dados sugerem que as amibas são particularmente eficientes a eliminar a interferência da flora contaminante e, por isso, devem ser especialmente utilizadas nestes casos (55).

Em Portugal, um grupo do CHLO-HEM e NMS|FCM, num estudo realizado com o objetivo de otimizar o diagnóstico da DL, testou a cultura de amibas em paralelo com as metodologias convencionais (cultura em BCYE- $\alpha$ , pesquisa direta de antígenos em secreções, pesquisa de antígenos na urina e PCR). Em 90 amostras analisadas, recuperou-se apenas um isolado na cultura em amibas que não fora detetado por nenhum dos outros métodos utilizados (12).

A metodologia LAMP baseia-se na amplificação isotérmica de ácidos nucleicos e tem vindo a ser utilizada de forma crescente no diagnóstico das doenças infecciosas (229). É um método simples que não necessita de termociclador nem de sondas marcadas, permitindo uma rápida amplificação dos ácidos nucleicos (<1h), a uma temperatura constante (60 a 65°C). A especificidade do método resulta da hibridação dos quatro ou seis *primers*, a seis ou oito locais complementares, consoante se utiliza só os *primers* internos e externos ou se adicionam os *primers* específicos para o *loop* formado durante o processo. O resultado pode obter-se de uma forma simples, por leitura visual do precipitado após centrifugação, ou da fluorescência, após junção de um composto intercalante na cadeia dupla de ADN. Pode ainda visualizar-se em gel de agarose, onde se observa um padrão semelhante ao de um marcador de pesos moleculares, devido à presença das múltiplas estruturas geradas durante a amplificação. A monitorização da reação pode ser feita em tempo real num turbidímetro, dado que o aumento da turvação é proporcional à quantidade de ADN sintetizado. (229).

A aplicação deste método ao diagnóstico da DL é recente, não sendo ainda uma prática corrente nos laboratórios de microbiologia, embora já se encontrem trabalhos publicados utilizando *Legionella* (6, 183).

Outra metodologia atualmente disponível para o diagnóstico microbiológico é os testes TAC. Estes testes baseiam-se na utilização de *cards* de microfluída e permitem a deteção simultânea

até 48 microrganismos. Esta tecnologia recente tem vindo a revelar-se muito útil na identificação do agente etiológico em estudos de vigilância epidemiológica em grande escala, em situações em que vários microrganismos podem causar sintomas similares (57, 125, 181).

Esta metodologia foi inicialmente utilizada no estudo das infeções respiratórias (308), mas atualmente, existem *cards* para outras infeções, como por exemplo, a diarreia, a sépsis ou as infeções do sistema nervoso central, podendo incluir para além da pesquisa do agente infeccioso e a pesquisa de resistência a antibióticos (57, 163).

A metodologia é rápida (resultado em 1h), completamente automatizada e permite analisar simultaneamente bactérias e vírus de ADN e de ARN. Os *cards* contêm 8 canais cada um com 48 poços de reação, permitindo a análise em paralelo de 8 amostras para 48 agentes diferentes. No total cada *card* tem 384 poços de reação. Em cada um dos poços são previamente adicionados os *primers* e a sonda liofilizados, sendo que no momento da utilização só é necessário a adição da enzima e o extrato de ácidos nucleicos a cada um dos canais (163).

Esta metodologia já é utilizada em alguns laboratórios, sendo a *Legionella* um dos microrganismos incluído no *card* das infeções respiratórias, existindo *primers* específicos para *Legionella* spp e para a espécie *L. pneumophila* (163, 273).

Destas metodologias, a que já se encontra implementada em muitos laboratórios para a identificação é o MALDI-TOF MS. A utilização desta tecnologia melhorou a identificação dos microrganismos patogénicos a partir de cultura, encurtando significativamente o tempo de resposta, das habituais 24 a 48h para 10 a 30 minutos (266). O método é menos dispendioso que os métodos de identificação tradicionais utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica, sendo o elevado investimento inicial no equipamento a sua principal desvantagem.

O perfil de proteínas resulta da ionização da amostra e separação dos iões em função da relação massa/carga. O método utiliza uma pequena quantidade de biomassa, podendo os ensaios realizar-se com uma única colónia. No final, a identificação é efetuada comparando o perfil proteico obtido com os existentes na base de dados.

Este método tem-se revelado útil na identificação de isolados de *Legionella*, especialmente em situação de surto (148). Mas para aumentar o poder discriminativo do método para *Legionella* spp é necessário garantir uma boa representatividade do género na base de dados. Os trabalhos de Moliner e colaboradores (2010) e Gaia e colaboradores (2011), ao estudarem os perfis de várias espécies de *Legionella*, deram um contributo importante para o enriquecimento da base de dados do MALDI-TOF MS (107, 210).

### 1.7.1 Critérios usados na definição de caso de Doença dos Legionários

Para a definição de caso de DL utiliza-se um critério clínico, ter pneumonia, e um ou mais critérios laboratoriais.

Os casos de DL são classificados de acordo com os resultados laboratoriais em casos confirmados ou casos prováveis, respetivamente, se apresentam o critério clínico e um ou mais critérios laboratoriais de caso confirmado ou de caso provável (76).

Critérios laboratoriais de caso confirmado:

- Isolamento de *Legionella* spp, a partir de secreções respiratórias ou outro produto biológico de local estéril;
- Detecção de antígeno *L. pneumophila* sg1 na urina;
- Aumento significativo do título de anticorpos para *L. pneumophila* sg1 em duas amostras com intervalo de duas semanas.

Critérios laboratoriais de caso provável:

- Detecção direta do antígeno *L. pneumophila* em secreções respiratórias ou tecido pulmonar;
- Detecção de *Legionella* spp por pesquisa de ADN em secreções respiratórias, tecido pulmonar ou outro produto proveniente de local estéril;
- Aumento significativo do nível de anticorpos para *L. pneumophila* não sg1 ou outra *Legionella* spp, em amostras de soro pares;
- Nível alto de anticorpos para *L. pneumophila* sg1 em amostra única de soro.

As novas metodologias não foram ainda considerados nestes critérios por não estar generalizada a sua utilização nem completamente estabelecido o seu potencial diagnóstico.

### 1.8. Terapêutica

Um diagnóstico atempado e a implementação precoce da terapêutica adequada influencia o prognóstico e a sobrevivência dos doentes com formas graves de DL. A *Legionella* é uma bactéria intracelular que após a inalação se desenvolve no interior dos macrófagos alveolares. Por este motivo o principal critério para o sucesso terapêutico da DL é a utilização de antimicrobianos que atinjam elevadas concentrações intracelulares (47). Assim, os antimicrobianos a utilizar deverão ser os macrólidos (azitromicina, claritromicina), as quinolonas (levofloxacina, moxifloxacina, ciprofloxacina), as tetraciclina e a rifampicina (só em associação). Dados recentes indicam que a levofloxacina (ou outra fluoroquinolona) ou a azitromicina são os antimicrobianos de eleição (25, 29, 47).

A duração da terapêutica depende do quadro clínico do paciente, sendo em geral recomendada a administração de antimicrobianos durante 7 a 10 dias, embora em doentes com imunossupressão severa deva prolongar-se até 21 dias (29).

### **1.9 Métodos de tipificação para vigilância epidemiológica**

Nos estudos epidemiológicos clássicos, as relações eram estabelecidas utilizando o tempo, o local e a pessoa. No entanto, em muitas das ocorrências atuais, estes parâmetros não fornecem a informação suficiente para identificar o foco infeccioso (116).

A tipificação de isolados é uma ferramenta muito útil quando ocorre um aumento inesperado de casos de doença, pois permite apurar, através da análise dos perfis fenotípicos e/ou genotípicos dos isolados recuperados das amostras biológicas colhidas nos doentes (isolados clínicos), se é um surto ou se um aglomerado fortuito de casos não relacionados. A tipificação permite discriminar diferentes perfis entre isolados da mesma espécie, possibilitando por vezes a identificação do reservatório e a via de transmissão e desta forma aumentar a eficácia das medidas de controlo e interromper a sua disseminação. Esta inferência tem por base a comparação dos resultados da tipificação dos isolados clínicos e dos isolados ambientais (recuperados de amostras recolhidas nos reservatórios ambientais). Esta ferramenta pode ainda ser utilizada para distinguir recidiva de re-infeção, identificar isolados patogénicos emergentes ou clones associados a um aumento de transmissão e virulência, por exemplo, quando da vigilância de ecossistemas ou na investigação de algumas doenças infecciosas; avaliar medidas de controlo de infeção, reconhecer infeção *versus* colonização e ainda, efetuar em estudos evolutivos. Nestes últimos, alguns métodos de tipificação permitem a construção de árvores filogenéticas e assim, determinar a estrutura de determinada população e estudar a evolução e diversificação dentro de uma mesma espécie (189, 191, 267, 289, 292, 303).

No decurso de uma doença infecciosa a tipificação pode ainda fornecer informações relevantes para o tratamento e/ou quanto à evolução da doença, como acontece na Hepatite C e com os Vírus do papiloma humano (67, 277).

Os métodos de tipificação ideais devem ser fáceis de executar e de interpretar, terem potencial para automatização e aplicação na rotina, não serem muito dispendiosos, gerarem rapidamente resultados e permitirem estimar a transmissão cruzada, isto é, pessoa a pessoa (116, 253, 267).

É importante ter presente que dos vários métodos de tipificação existentes nenhum deles, por si só, resolve os objetivos de todas as formas de investigação. É crucial conhecer as vantagens e as limitações de cada um, para efetuar a seleção mais adequada e conjugar os que se complementam. A escolha do método a utilizar deve ter em conta a sua capacidade de tipificação, o poder discriminante, a concordância epidemiológica e a reprodutibilidade (162, 267, 289).

Os primeiros métodos de tipificação analisavam as características fenotípicas, tais como, o padrão de atividade metabólica, a morfologia das colônias, a suscetibilidade ou resistência a determinados bacteriófagos, a resistência ou suscetibilidade a antibióticos, a presença ou ausência de determinados antígenos, proteínas, enzimas ou ácidos gordos. Uma das principais desvantagens destes métodos é não permitirem a diferenciação de alguns isolados, sendo por isso pouco discriminantes. Mas para além desta, a maioria das metodologias utilizadas é laboriosa e exige pessoal treinado para a execução e para a interpretação dos resultados. Algumas utilizam equipamentos dispendiosos e que não estão disponíveis na maioria dos laboratórios, ou a manutenção de material biológico viável (exemplo, os bacteriófagos). Há ainda metodologias que apresentam baixa reprodutibilidade ou cujos resultados são dependentes da qualidade dos reagentes utilizados, podendo em alguns casos ocorrer reações cruzadas (116, 162, 289). Apesar das desvantagens enumeradas, alguns métodos continuam a desempenhar um papel importante na tipificação de certos isolados, por exemplo, *Salmonella*, *Legionella*, *Shigella* ou *Streptococcus pneumoniae* (14, 134, 187, 245, 260).

Importa ressaltar que a expressão de algumas características fenotípicas pode variar em função das condições ambientais em que a estirpe se desenvolveu, pelo que os resultados devem ser sempre cuidadosamente interpretados e nunca devem ser utilizados em estudos evolutivos (289).

As metodologias que podem ser utilizadas no estudo das características fenotípicas são: as técnicas de aglutinação, imunofluorescência indireta ou ELISA, na deteção de antígenos expressos na superfície da membrana celular (lipopolissacarídeos, proteínas, flagelos, fimbrias), SDS-PAGE ou o Western-blot, na análise de extratos de proteínas solúveis, e MLEE, na análise da mobilidade eletroforética de enzimas intracelulares.

Outras metodologias, MALDI-TOF e FTIR, inicialmente desenvolvidas para outros fins têm vindo a ser utilizadas na tipificação de isolados de algumas bactérias com resultados promissores (60, 113, 151, 271).

O reconhecimento do cromossoma bacteriano como molécula fundamental da identidade celular veio demonstrar a importância da avaliação genómica (molecular) durante os estudos epidemiológicos. O estudo deste componente permite avaliar a proximidade filogenética entre os isolados e por isso, a aplicação de métodos de tipificação genotípica aumenta a exatidão das conclusões. Assim, dependendo da metodologia escolhida é possível a caracterização parcial ou total do genoma (17, 18, 162, 178, 267, 289).

Nas últimas três décadas, os métodos moleculares têm progressivamente substituído os fenotípicos por apresentarem, entre outras, a vantagem de originarem dados cuja interpretação não é subjetiva e por isso podem ser transferidos entre laboratórios, isto é, os resultados podem ser comparados mesmo que a análise dos isolados seja efetuada por equipas diferentes. Esta característica é fundamental no contexto atual, em que muitas das emergências em saúde

pública têm dimensão alargada. Nestas situações os estudos epidemiológicos envolvem várias entidades, pelo que é imperioso a utilização de metodologias padronizadas, com nomenclaturas simples e universais, com elevada reprodutibilidade e que permitam facilmente a criação de bases de dados acessíveis via Internet. Estas características são evidenciadas por muitas das metodologias utilizadas na tipificação genotípica, pelo que a sua utilização em estudos epidemiológicos tem-se revelado crucial para a efetiva permuta de dados e a rápida resolução das ocorrências (108, 162, 178, 189, 205, 232, 257, 264, 267).

Para além deste aspeto, sabe-se que a diversidade dentro de uma espécie bacteriana resulta de três eventos genéticos: transferência horizontal, perda ou aquisição de genes e recombinação, pelo que só os métodos genotípicos têm poder discriminante suficiente para analisar este tipo de relações entre espécies microbianas (32, 118, 162).

Os métodos genotípicos podem ser divididos em três grandes grupos: (a) métodos baseados em hibridização de ADN utilizando sondas nucleotídicas, (b) métodos baseados em padrões de bandas de ADN, (c) métodos de sequenciação de ADN:

a) Os métodos baseados na hibridização baseiam-se na complementaridade entre sondas e ADN genómico, podendo ser realizados com ou sem utilização de enzimas de restrição e com ou sem amplificação prévia do ADN por PCR. As sondas utilizadas são fragmentos de sequências de ADN marcadas com átomos radioativos, corantes fluorescentes ou cromogéneos. São exemplo destes métodos: *Southern blot*, ribotipagem e *microarrays* de ADN;

b) Os métodos baseados em padrões de bandas classificam as bactérias de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados pela amplificação e/ou digestão enzimática do ADN genómico pelas endonucleases de restrição. O número e o tamanho dos fragmentos gerados variam em função da enzima utilizada, se é de corte frequente ou raro. São exemplo destes métodos: AFLP, PFGE, RAPD, RFLP, REP-PCR;

c) Os métodos de sequenciação estudam a sequência de nucleótidos num fragmento de ADN genómico. Este método tem como principal vantagem a interpretação uniforme dos resultados, que se baseiam exclusivamente em quatro caracteres (código genético). A sequenciação do ADN pode ser total ou parcial (sequenciação de um gene ou cinco a sete genes ou ainda, de regiões entre genes). São exemplo destes métodos: MLST, MLVA, SBT, SLST, WGS (178, 191, 253, 267, 289).

### 1.9.1 Tipificação de isolados do género *Legionella*

Para determinar quais os métodos de tipificação mais utilizados no estudo de isolados do género *Legionella* efetuou-se uma pesquisa na base de dados da *Pubmed*, sem restrição de idioma ou ano de publicação, usando as seguintes combinações de palavras-chave: “*Legionella* [AND] typing”, “*Legionella* [AND] AFLP”, “*Legionella* [AND] AP-PCR”, “*Legionella* [AND] MABs”, “*Legionella* [AND] MLEE”, “*Legionella* [AND] PFGE”, “*Legionella* [AND] RAPD”,



“Legionella [AND] RFLP”, “Legionella [AND] SBT”, “Legionella [AND] WGS”. Para a identificação dos métodos que têm sido aplicados no estudo dos isolados clínicos e/ou ambientais recorreu-se aos resumos ou, quando estes não foram suficientemente elucidativos, ao material e métodos dos artigos selecionados.

No total foram analisadas 299 referências, das quais 95 foram excluídas por se tratar de artigos de revisão, de ensaios de novas metodologias, de identificação em amostras biológicas ou ambientais, ou ainda por o resumo não ser explícito sobre o método utilizado e o artigo não estar disponível. Os artigos selecionados foram publicados entre Junho de 1986 e Agosto de 2016.

A análise revelou que em 54% (110/204) dos estudos foi utilizado um método de tipificação, em 28% (57/204) foram usados em simultâneo dois e nos restantes 18% (37/204) os autores recorreram a três ou mais métodos para estudar os isolados de *Legionella*. SBT foi o método mais utilizado, tendo sido aplicado em 44% (89/204) dos estudos, seguido do PFGE e MAb, respetivamente 28% (57/204) e 27% (55/204). O AFLP foi usado em 10% (20/204) dos artigos e os restantes métodos (AP-PCR, MLEE, RAPD, REA, RFLP, sequenciação dos genes *mip* e 16S do ARNr ou WGS) somente entre 5% (10/204) a 3% (6/204). Metodologias como análise de plasmídios, CRISPR, IRS-PCR, *microarrays*, MLVA, nested-SBT, ribotipagem, sequenciação do gene *mpb*, *rpoB* e 5S, SDS PAGE e *Southern-blot* foram utilizadas em 3 ou menos estudos.

Em 30% (17/57) dos estudos que recorreram a dois métodos a escolha recaiu sobre o MAb e SBT e em 14% (8/57) sobre PFGE e SBT. Entre os estudos que utilizaram MAb, 75% (41/55) recorreram ao painel de Dresden.

Sobre a longevidade de utilização das diferentes metodologias os MAb foram usados durante todo o período em análise (1986 a 2016), PFGE entre 1992 e 2015, AFLP entre 2000 e 2014, SBT surgiu só em 2005 e WGS em 2013.

Resumindo, os números apresentados mostram que as metodologias de tipificação mais utilizadas no estudo de isolados do género *Legionella* são: MAb (método fenotípico) e/ou SBT, PFGE e AFLP (métodos genotípicos).

#### **1.9.1.1 Anticorpos monoclonais (MAbs)**

A utilização de MAb permite identificar diferenças antigénicas entre isolados e, no caso do género *Legionella*, dividir a espécie *pneumophila* em diferentes serogrupos e o *sgl* em vários subgrupos. As bactérias fixadas com formol são classificadas de acordo com a sua reatividade aos diferentes MAb. Para esta avaliação podem ser utilizadas técnicas de imunofluorescência, microaglutinação ou ELISA (134, 155, 192, 228, 300).

A diferenciação revelou ser útil do ponto de vista taxonómico e epidemiológico e, por esse motivo, ao longo dos anos foram sendo produzidos vários painéis de MAb (132, 153, 154, 200,

228). A maioria destes painéis nunca foi comercializada e por isso só estava acessível a laboratórios de referência. Entre estes há dois painéis que se destacaram, o *standard*, desenvolvido por Joly e colaboradores, e o de Dresden, desenvolvido por Helbig e colaboradores. O painel *standard* era constituído por sete MABs, MAB1, MAB2, MAB3, W32, 33G2, 32A12, 144C2, e já não é produzido (155), tendo o MAB2 sido associado a um maior potencial de virulência por se ter verificado que nos isolados clínicos, inversamente ao que acontecia nos isolados ambientais, era frequentemente expresso (133). O painel de Dresden é igualmente constituído por sete MABs, MAb Lp1, MAb3/1, MAb8/4, MAb10/6, MAb20/6, MAb26/1 e o MAB3 do painel *standard*, tendo o MAb3/1 o mesmo padrão de reação que o MAB2, isto é, o epítipo do LPS da membrana externa reconhecido por este MAb foi associado com a virulência da *L. pneumophila* (132, 133). Este é o painel que mais vezes foi utilizado na avaliação das características fenotípicas dos isolados, como por exemplo, em 2002, num estudo multicêntrico europeu em que Portugal também participou, que analisou 1335 isolados não relacionados (135).

Num estudo realizado entre membros do EWGLI, o poder discriminante do painel de Dresden foi baixo (IDS=0,838), embora a concordância epidemiológica tenha sido máxima (E=100%) (99).

### 1.9.1.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

O PFGE foi considerado o método de referência para a tipificação de isolados de bactérias clinicamente importantes, como é o caso da *Legionella* (184, 226, 259).

Nos anos 90 foi o método de eleição para os estudos epidemiológicos, continuando, ainda hoje, a ser frequentemente utilizado para caracterizar isolados provenientes de surtos, especialmente se pertencerem a outras espécies que não a *pneumophila* (30, 185, 252, 301). Este sucesso resulta do seu excelente poder discriminante e elevada concordância epidemiológica. O método permite estudar a totalidade do cromossoma bacteriano após a digestão com endonucleases de restrição de corte pouco frequente, que no caso da *Legionella* são a *NotI* e a *SfiI* as mais utilizadas. O PFGE inicia-se com a lise da cultura incorporada em agarose, a que se segue a digestão do genoma, que em média origina 10 a 20 fragmentos com tamanhos muito variáveis, entre 10kb e 10Mb. A separação dos fragmentos realiza-se em gel de agarose, ao qual se aplica uma corrente elétrica que periodicamente alterna num ângulo de 90 graus. Este método tem como principais desvantagens ser laborioso, tecnicamente exigente, requerendo a utilização de equipamento dispendioso e ainda o facto de os dados não serem facilmente comparáveis entre laboratórios, pelo que não permite a criação de bases de dados alargadas a várias entidades (152, 178, 188, 253).

Num estudo multicêntrico realizado em 1999, envolvendo membros do EWGLI, verificou-se que o PFGE tinha um desempenho diferente conforme a endonuclease utilizada, *SfiI* ou *NotI*,

sendo que a primeira apresentava um poder discriminante maior ( $IDS=0,990$ ), mas a complexidade dos perfis aumentava, tornando difícil a interpretação visual do gel. O valor de concordância epidemiológica obtido com este método foi baixo ( $E=0,24$ ), resultante da subjetividade na interpretação dos perfis por falta de padronização, por um lado, e por outro, por dificuldade em distinguir bandas com tamanhos quase idênticos. O recurso à utilização de *software* de análise não diminuiu a variabilidade intra e inter laboratorial. Aceitando como critério que isolados com duas bandas de diferença são indistinguíveis, o IDS baixa para 0,983 mas o E sobe para 0,59 (99). Este critério é diferente do proposto por Tenover e colaboradores, geralmente adotado em estudos epidemiológicos de surtos. Estes autores consideram, “isolados indistinguíveis”, os que apresentam o mesmo perfil de bandas, “relacionados”, quando têm duas a três bandas de diferença, “com provável relação”, se o número de diferenças se situar entre quatro e seis e como “não relacionados”, os isolados com mais de sete diferenças (279).

Estes dados sugerem a necessidade de utilizar um método que combine o poder discriminante oferecido pela utilização de endonucleases de restrição e a rapidez dos métodos baseados no PCR e ainda, que apresente uma boa reprodutibilidade entre laboratórios (99, 188).

#### **1.9.1.3 Polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP)**

O AFLP combina as vantagens da utilização de endonucleases de restrição e a precisão e rapidez do PCR, sendo por isso considerado um excelente método para a detecção de polimorfismos do ADN. O método compreende três etapas: (i) digestão de ADN genómico com endonucleases e ligação de adaptadores (dois oligonucleótidos), (ii) amplificação específica dos fragmentos usando *primers* direcionados para as sequências dos adaptadores (não sendo assim necessário conhecer a sequência do ADN em estudo) (iii) análise dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (99, 100, 178, 188, 253, 289). Este método foi pela primeira vez aplicado ao estudo de bactérias do género *Legionella* em 1995 por Valsangiacomo, tendo-se mostrado eficiente, económico, reprodutível e mais rápido que o PFGE (287).

Num estudo multicêntrico realizado pelo EWGLI, em 1999, apresentou um  $E=1$  e um  $IDS=0,891$ , valor que embora próximo do considerado como desejável (144) é abaixo do valor de 0,95, referido como ideal para um método de tipificação (276). No entanto, o AFLP em conjugação com os MAb's do painel de Dresden apresentou um  $IDS=0,963$  (99).

No contexto de uma investigação epidemiológica de um *cluster* de DL associada a viagens, os isolados dos doentes e dos nichos ecológicos suspeitos podem ser obtidos em laboratórios de países diferentes, pelo que a sua análise exige a utilização de métodos cujos resultados possam ser comparáveis ou então obriga a transporte dos isolados entre laboratórios, o que não é desejável. O EWGLI, ciente desta dificuldade, propôs-se desenvolver um protocolo de referência que pudesse ser aplicado nestas situações. De entre os métodos existentes, o AFLP

apresentava as características desejadas de rapidez, baixo custo, poder discriminante e concordância epidemiológica. A estratégia seria predefinir perfis padrão (AFLP-tipo) identificados pela aplicação deste método a uma coleção de 130 estirpes representativas dos isolados europeus. Os 31 perfis obtidos serviriam de modelo para comparar os perfis dos isolados em estudo (101). Na tentativa de evitar erros devido à aplicação de protocolos diferentes, o EWGLI padronizou todos os parâmetros de execução e análise dos resultados, desenvolveu uma aplicação informática que permitia o acesso *online* aos 31 AFLP-tipo e implementou um programa regular de monitorização da *performance* dos laboratórios membros. Os resultados obtidos neste programa mostraram que, apesar da padronização estabelecida, ainda havia variações significativas na análise dos perfis de bandas, mesmo entre os laboratórios que usaram o *GelCompar* ou o *BioNumerics*. Estas discrepâncias não resultavam da execução do método mas de diferenças nas resoluções dos sistemas de captura da imagem dos géis (100, 101). Para evitar esta dificuldade e melhorar a reprodutibilidade do método foi desenvolvida uma variante (fAFLP) em que um dos *primer* é ligado a um composto fluorescente (Cy5) sendo, posteriormente, os fragmentos detetados num sequenciador (102, 104, 178, 188, 289).

Apesar das dificuldades na análise dos perfis de bandas, o método tem a vantagem de ser fácil de executar, não necessita de equipamento suplementar ao usualmente existente num laboratório e apresenta bons resultados no estudo de isolados a nível local, continuando por isso a ser utilizado em estudos epidemiológicos em vários laboratórios (91, 156, 161, 179, 258).

#### **1.9.1.4 Tipificação baseada em sequências (SBT) e algoritmos de análise**

Atualmente o SBT é internacionalmente reconhecido como o método padrão para caracterizar genotipicamente os isolados de *L. pneumophila*, pelo que a maioria dos estudos epidemiológicos dos últimos anos utiliza este método (108, 232, 257, 264).

O método apresenta a grande vantagem de a análise dos resultados não ser subjetiva, permitindo que a tipificação dos isolados provenientes de um *cluster* ou surto possa realizar-se em laboratórios diferentes sem comprometer as conclusões. O SBT baseia-se na sequenciação de fragmentos internos dos genes *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* e *neuA*, variando a zona de análise entre 182 e 473 bp. O método foi padronizado pelo EWGLI e o perfil alélico (ST) do isolado é obtido após submissão das sete sequências a uma base de dados de acesso restrito criada por este grupo europeu (disponível em:

[http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)).

O SBT baseia-se no MLST mas, ao invés deste, os genes selecionados estão sujeitos a pressão seletiva. Num estudo inicial, Gaia e colaboradores verificaram que dos sete genes escolhidos, o *acn*, *groES*, *groEL* e *recA* apresentavam menor variação que os outros três (*flaA*, *proA* e *mompS*). Verificaram ainda que o poder discriminante dos três últimos em conjunto (IDS=0,924) era maior que o de cada um individualmente (IDS=0,767 a IDS=0,857) (105). No

entanto, o valor de IDS ainda era abaixo de 0,95, que como já foi referido, é considerado o valor ideal para um sistema de tipificação. Mas estes autores verificaram que a tipificação usando estes genes em conjugação com os MABs do painel de Dresden elevava o valor para IDS=0,971 (105). Com o objetivo de melhorar o poder discriminante do método, os quatro genes que apresentavam menor variação foram substituídos pelos genes *asd*, *mip* e *piE*. Com os seis genes, obtinha-se um IDS=0,943, passando para IDS=0,981 quando o estudo era complementado com os MABs de Dresden (106). Numa fase posterior, em 2007, o SBT foi alargado a um sétimo gene (*neuA*). No estudo realizado por Ratzow e colaboradores, este novo gene permitiu dividir em cinco subgrupos os isolados pertencentes ao ST1, o mais prevalente a nível mundial. Esta alteração melhorou o poder discriminante do método, que neste estudo aumentou de D= 0,932 (SBT - seis genes) para IDS=0,963 (SBT - sete genes) (239).

Como já foi referido, o painel é constituído por sete genes e permite estudar isolados de todos os serogrupos da *L. pneumophila*, embora algumas estirpes pertencentes a outros serogrupos que não o sg1, não sejam amplificadas pelos *primers* do *neuA*. Farhat e colaboradores, após sequenciarem numa estirpe do sg5 o locus referente a este gene, verificam que nessa região estava uma variante do gene, que tinha a mesma função mas que apenas apresentava 68% de homologia com o gene *neuA*. Para ultrapassar o problema e conseguir a amplificação deste gene homólogo (*neuAh*), os investigadores desenharam outros *primers* que são utilizados sempre que os iniciais não dão amplificação (86, 203). Persistem, no entanto, algumas estirpes do sg11 que não são amplificadas por nenhum dos pares de *primers* (*neuA* ou *neuAh*) (203).

Como complemento à padronização do SBT, a HPA estabeleceu um programa internacional de avaliação externa de qualidade. Este programa foi distribuído até 2014 pelos centros colaboradores da Europa (incluindo o nosso, na NMS) e por outros laboratórios fora da Europa (Austrália, Canadá, Japão e EUA). Os resultados das sucessivas distribuições mostram uma melhoria crescente na *performance* dos laboratórios participantes. A reprodutibilidade obtida com este método foi sempre maior do que a verificada em avaliações similares com outras metodologias. O programa de avaliação permitiu não só melhorar o desempenho dos laboratórios, como alargar a utilização do método (71, 188).

Em situações de surto, a rapidez na caracterização dos isolados é essencial para a identificação do reservatório responsável pela infeção e para a implementação de medidas que controlem a disseminação da bactéria. Todos os métodos de tipificação referidos anteriormente utilizam culturas puras, das quais é possível obter grandes quantidades de ADN. Mas dadas as características da *Legionella*, crescimento lento e necessidade de um meio de cultura específico nem sempre disponível em todos os laboratórios, atualmente o diagnóstico é frequentemente efetuado por antigenúria e por PCR, o que implica a não obtenção de culturas em muitas situações. Por estes dois motivos, necessidade de diminuir o tempo de resposta e não existência de cultura, é importante desenvolver uma metodologia que permita a tipificação diretamente nas

amostras biológicas. A utilização do SBT diretamente das amostras já foi testada em alguns estudos com resultados aceitáveis (103, 186). No entanto, no estudo realizado por Ginevra e colaboradores, os investigadores verificaram que só em 3,2% (2/63) das amostras testadas foram obtidas as sequências de todos os genes, sendo o *flaA* o gene menos vezes amplificado. Para aumentar a eficiência do método, os investigadores desenvolveram uma técnica de *nested*-PCR (NPSBT), que utiliza os *primers* do SBT na segunda amplificação. Neste estudo e com a NPSBT conseguiram sequências dos sete genes em 54% (34/63) das amostras testadas, isto é, a eficiência aumentou 16,4% em relação ao SBT (114). Embora o problema não esteja completamente resolvido, pois o método não consegue amplificar todos os genes em todas as amostras, ele tem vindo a ser utilizado com sucesso em algumas investigações de surtos (75, 204, 257, 264).

Os dados obtidos com os métodos que se baseiam na análise de sequências de genes, isto é, similares ao MLST, têm vindo a ser utilizados, não só para inferir a relação entre os isolados analisados, mas também para estabelecer padrões de evolução entre genótipos similares. Anteriormente, as relações entre os isolados eram evidenciadas através de dendrogramas que utilizavam na formação dos grupos um método designado de UPGMA, mas este tipo de análise não reflete os eventos evolutivos recentes. A utilização de programas como o eBURST ou o goeBURST permite elaborar modelos evolutivos hipotéticos que teorizam sobre o aparecimento e divergência dos complexos clonais (CC). O algoritmo divide os dados em grupos de isolados relacionados agrupados em CC, com base nas diferenças entre perfis alélicos. Dentro de cada CC o algoritmo identifica, através de réplicas sucessivas, o fundador a partir do qual derivam um ou vários descendentes. Os isolados que pertençam ao mesmo CC têm uma maior probabilidade de descenderem de um ancestral comum (87, 92, 289). Nos últimos anos, estes algoritmos têm sido utilizados no estudo de populações de *Legionella* de diferentes regiões ou países (5, 17, 71, 172, 282).

#### 1.9.1.5 Sequenciação total do genoma (WGS)

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento na área da bioinformática e nas plataformas utilizadas na sequenciação, deu um novo impulso à tipificação de microrganismos permitindo a sequenciação total do genoma (WGS).

O potencial oferecido pela tecnologia *Next-generation sequencing* (NGS) revolucionou o processo, diminuindo drasticamente os custos e o tempo necessário ao processamento das amostras. O princípio do método é similar à sequenciação de Sanger: a ADN polimerase catalisa a incorporação de dNTPs marcados com compostos fluorescentes que são identificados em cada ciclo após excitação do fluoróforo. A diferença é que na NGS o processo estende-se ao mesmo tempo a milhões de fragmentos. Resumidamente, numa primeira etapa, o ADN é cortado aleatoriamente e posteriormente ligado a adaptadores, seguindo-se a amplificação por PCR e a

purificação em gel. Os fragmentos são capturados numa célula de fluxo, onde ficam ligados pelos adaptadores, sendo posteriormente amplificados em clones distintos. A sequenciação é o passo seguinte, variando o procedimento segundo a plataforma utilizada (Illumina, Ion Torrent ou Pacific Biosciences). A última etapa é o alinhamento e análise dos fragmentos obtidos, processo que apenas será possível recorrendo à bioinformática, dado que são gerados milhões de fragmentos com tamanhos variáveis que podem atingir até 3kb (17, 49, 178, 253).

Comparativamente com o que acontecia no passado, esta nova metodologia permite que a WGS se faça em tempo real, isto é, com os resultados a serem obtidos ao mesmo tempo que os dos outros métodos de tipificação. A WGS tem-se demonstrado útil na vigilância epidemiológica, assim como no estudo de isolados de *Legionella* obtidos no decurso de surtos, possibilitando a discriminação entre isolados relacionados e não relacionados com o surto. O método permite um nível de discriminação elevado, mas ainda é muito laborioso e a análise dos dados implica a utilização de programas informáticos complexos, por isso ainda não foi possível a sua implementação na rotina da tipificação (49, 162, 243, 253).

A WGS tem sido, no entanto, aplicada em algumas investigações de surtos de DL, sendo que na maioria dos estudos a análise utilizada baseou-se no mapeamento das sequências e a comparação com um genoma de referência, para deteção de polimorfismos (SNP) (124, 171, 206, 243, 257, 264). De entre estes estudos, há um que importa referir, por as suas conclusões alterarem uma parte da história da *Legionella*. Mercante e colaboradores sequenciaram o genoma dos quatro isolados recuperados, em 1976, de doentes do surto de Filadélfia. A análise retrospectiva dos quatro isolados demonstrou que existe uma diferença de 2900 SNPs entre o genoma de um dos isolados e os outros três. Estas diferenças colocam os isolados em dois ramos distintos na árvore filogenética e a uma distância maior que a esperada para isolados recuperados durante o mesmo surto. Na altura, apesar da intensa investigação ambiental desenvolvida, não foi possível isolar nenhuma *Legionella* no hotel nem na área circundante, ficando por identificar o foco infeccioso. Para além disso, na revisão dos processos dos doentes verificou-se que o isolado que se posicionou separadamente foi recuperado de um doente que não esteve na conferência, contrariamente aos outros três isolados que foram recuperados de congressistas. Esta informação conjuntamente com os dados agora obtidos por WGS, permitem demonstrar que este isolado não pertencia ao surto do hotel (206).

Com a WGS é possível virtualmente analisar 100% do genoma, obtendo desta forma uma elevada discriminação. No entanto, é importante padronizar procedimentos, uniformizar a extensão da região a analisar e definir o *cut-off* abaixo do qual os isolados são considerados idênticos. Sem estas condições definidas é difícil, por um lado, criar bases de dados comuns, e por outro, utilizar toda a informação obtida nos estudos com isolados de *L. pneumophila* (49, 162, 243, 253). Sendo este um tema muito recente, ainda não existem consensos relativamente a estes critérios.

A equipa de Moran-Gilad propôs que a estratégia mais correta fosse a análise de um grupo de genes situados no centro do genoma da *L. pneumophila*, uma abordagem diferente da análise dos SNPs que tem vindo a ser utilizada noutros estudos. Este esquema incluiria a análise de 1521 genes o que corresponde a 47,2% do genoma completo da estirpe Philadelphia (216). Outros investigadores utilizaram 1896 genes, considerando este o núcleo mínimo por estar presente em todos os isolados de *L. pneumophila* por eles estudados (n=53), concluindo ser um esquema com elevado poder de resolução para subdividir isolados pertencentes ao ST1 que, como já referido, é um perfil muito prevalente em todo o mundo. Um outro grupo, que inclui elementos do EWGLI, considera que o ideal seria estabelecer um esquema com 50 genes, nos quais estão incluídos os genes do SBT (49).

O genoma da *L. pneumophila* compreende aproximadamente 3,4 Mbp e cerca de 3100 genes, este elevado número de genes reflete a capacidade da bactéria em se adaptar a diferentes hospedeiros e condições ambientais. O núcleo central do genoma contém cerca de 80% dos genes e os genes específicos de cada estirpe representam 7 a 11% do genoma, o que é um valor elevado, comparativamente a outras bactérias. O genoma da *L. pneumophila* revela alta plasticidade, apresentando muitos elementos genéticos móveis, ilhas de patogenicidade, plasmídeos ou *like*-plasmídeos e um elevado número de proteínas similares com os eucariotas ou com domínios eucariotas. Este genoma altamente dinâmico evolui por transferência horizontal de genes mediada pelo sistema de secreção tipo IV. Este procedimento permite à bactéria subverter as funções do hospedeiro e estabelecer um nicho protetor para a replicação intracelular e assim sobreviver. (17, 31, 118, 119, 162).

Todo este dinamismo genómico gera uma elevada diversidade de genomas dentro do género *Legionella*. Até agora, já se encontram totalmente sequenciados genomas de quatro espécies (*pneumophila*, *longbeachae*, *fallonii* e *hacheliae*). No entanto, dentro da espécie *pneumophila* o número de genomas totalmente sequenciados eleva-se a 550, estando sequenciados genomas das subespécies *fraseri*, *pascullei* e *pneumophila*. Da subespécie *pneumophila* existem vários isolados cujo genoma está totalmente sequenciado: as estirpes Philadelphia, Paris, Lens, Corby, Alcoy, os STs mais prevalentes ST1, ST23, ST37, ST42, ST62 e também a estirpe responsável pelo surto na região de Vila Franca de Xira (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/416?> Acedido a 26 de Janeiro de 2017).

### 1.10 Estudos realizados em Portugal sobre *Legionella* e Doença dos Legionários

Apesar de algum interesse que a *Legionella* e a DL têm despertado entre a comunidade científica portuguesa, o conhecimento da epidemiologia deste microrganismo e da doença por ele provocada em Portugal é escasso. Destacam-se, no entanto, duas equipas que se têm dedicado, uma ao estudo de isolados ambientais (equipa de Coimbra) e outra a estudos na área do diagnóstico e dos isolados clínicos (equipa de Lisboa).



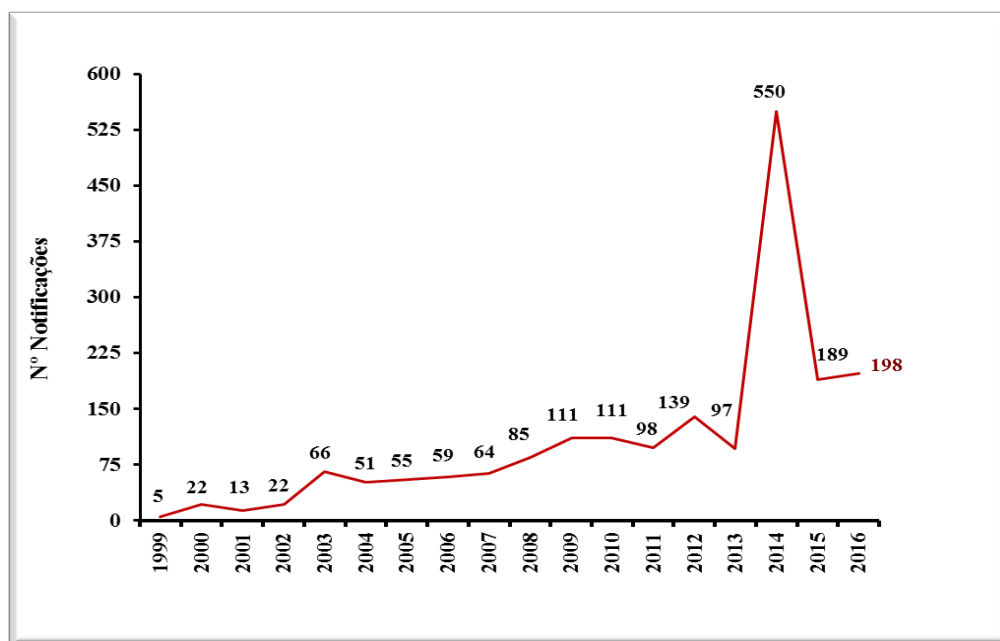
A presença da bactéria no nosso país já é conhecida desde 1981, ano em que Levi Guerra e colaboradores relataram o primeiro caso de DL (128). Depois deste, outros casos foram descritos, e em 1996 foram descritos 74 casos confirmados de pneumonia por *Legionella* (195).

O primeiro estudo realizado em Portugal com isolamentos de *Legionella* no ambiente foi efectuado por Veríssimo e colaboradores, em 1990, e abordou a colonização dos tabuleiros de humedificação das incubadoras de uma unidade de neonatologia. A equipa de investigação verificou que cinco dos sete tabuleiros das incubadoras da unidade estavam contaminadas com *Legionella* e o foco da infeção era um dos sistemas de água quente que fornecia a unidade (297). A presença da *Legionella* em águas hidrotermais em Portugal foi alvo de investigação pela equipa de Coimbra. Num primeiro estudo nos anos 90, monitorizou durante um ano quatro áreas hidrotermais (três no norte e centro de Portugal continental e uma em São Miguel-Açores). Os resultados da investigação mostraram que estes ambientes constituem um importante reservatório natural destes microrganismos. Maioritariamente foi isolada *L. pneumophila* sg1 (74.3%) em Portugal continental e *L. pneumophila* sg6 nos Açores (na área estudada não foi isolada *L. pneumophila* sg1). Dos isolados do sg1, 96% pertenciam ao subgrupo OLDA ou Bellingham. Para além da *L. pneumophila* outras espécies foram identificadas: *L. bozemanii* sg2, *L. dumoffii*, *L. micdadei*, *L. moravica*, *L. oakridgensis*, *L. sainticrucis* e *L. sainthelensi* (298). Mais tarde num outro estudo, monitorizou durante sete anos águas subterrâneas de duas zonas hidrotermais do centro de Portugal, confirmando a existência de colonização por *Legionella* embora, em valores baixos e de forma não uniforme. Nesta investigação a equipa voltou a recuperar *L. pneumophila*, *L. oakridgensis*, *L. sainthelensi* e *L. londiniensis* (42). Em estudos posteriores a mesma equipa demonstrou que a aplicação de UV em pontos-chave é um método eficaz de controlo da colonização dos sistemas de distribuição de águas hidrotermais (43). Para além desta área de investigação a equipa tem-se debruçado nos últimos anos à evolução molecular dos isolados de *L. pneumophila* recuperados em Portugal. Numa primeira fase, inferindo a estrutura genética da população a partir da análise dos genes *dotA* e *rpoB* e posteriormente, do gene *sidf*. Dedicou-se ainda ao estudo da evolução molecular dos genes *dotA*, *lspD*, *lspE*, *pilD*, *proA*, *srnA* e *sidJ* a fim de determinar qual o papel destes genes no processo adaptativo da espécie a diferentes hospedeiros (44, 45, 46).

Os primeiros estudos sobre isolados clínicos em Portugal foram efetuados por Marques e colaboradores, a propósito de um surto epidémico de infeção hospitalar por *L. pneumophila* sg1, num hospital da área de Lisboa que realizava transplantes de rim e de coração (grupo de risco para a DL) (194). A mesma equipa avaliou a presença de anticorpos anti-*Legionella* na população portuguesa saudável. Para isso foram testados 500 dadores de sangue entre os 18 e 65 anos (250 dadores da área do Porto e 250 da área de Lisboa), verificando que 61% da população

estudada possuía anticorpos anti-*Legionella* no soro, demonstrando assim, contato com a bactéria (195). Foi ainda alvo de estudo por esta equipa a utilização da técnica do E-test para a avaliação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos de isolados portugueses (196).

Apesar das evidências da existência da bactéria em Portugal e de as notificações da DL serem obrigatórias desde 1999, a incidência conhecida da doença era muito baixa. Com a implementação do PVig Ep In da DL, a situação foi melhorando tendo-se verificado que a partir do surto de Vila Franca de Xira, em 2014, o número de notificações aumentou (Figura 4).



**Figura 4** - Número de casos notificados de DL, em Portugal, 1999 – 2016.  
Os dados de 2016 são provisórios (fonte: DGS, dados não publicados)

Este acontecimento veio relembrar a importância das bactérias do género *Legionella* e da implementação e manutenção de medidas de prevenção eficazes, que evitem a colonização de sistemas disseminadores de aerossóis com estirpes virulentas da bactéria.

### 1.11 Objetivos do nosso trabalho experimental

Tal como se poderá depreender ao longo deste capítulo “Introdução”, a epidemiologia da Doença dos Legionários e a interação da *Legionella* com os protozoários são áreas fundamentais na atual investigação científica sobre esta bactéria e as infeções por ela provocadas.

Assim, o presente trabalho procurou abordar tópicos específicos dentro da vertente epidemiológica e da multiplicação intracelular em protozoários, tendo desta forma, como objetivos gerais:

1. Conhecer a epidemiologia da DL em Portugal, com particular ênfase na caracterização da população de *L. pneumophila*, a espécie responsável pela maioria dos casos de doença, utilizando as metodologias preconizadas pelo EWGLI.

Para a concretização deste objetivo geral, foram realizadas as seguintes tarefas:

- Tipificação dos isolados responsáveis por infeção humana em Portugal, entre 1987 e 2016, utilizando os MAb's do painel de Dresden e o SBT.
- Identificação da diversidade fenotípica e genotípica dos isolados recolhidos, de forma a determinar a estrutura da população de *L. pneumophila* que em Portugal provoca DL.
- Identificação de estirpes específicas do nosso país, através da comparação com as estirpes que circulam em outras áreas geográficas, recorrendo-se à BD-EWGLI/SBT.
- Investigação das relações evolutivas entre as estirpes identificadas em Portugal e sua integração na epidemiologia geral da *L. pneumophila*. Para estas avaliações utilizou-se o algoritmo eBURST.
- Avaliação numa sub-amostra do poder discriminante de três métodos diferentes de tipificação (Mab's do painel de Dresden, AFLP e SBT).
- Estudo dos isolados clínicos e ambientais recolhidos ao longo de 26 anos, no decurso de vários casos esporádicos e pequenos surtos de infeção hospitalar num hospital da área de Lisboa, aplicando quatro métodos diferentes de tipificação (MAB's do painel de Dresden, AFLP, SBT e WGS)

2. Estudar a interação *L. pneumophila* - *A. castellanii*, com especial realce para o estudo da capacidade invasiva de diferentes estirpes de *L. pneumophila* em *A. castellanii* e para a avaliação do transcrito da bactéria após contato com este hospedeiro.

No desenvolvimento desta segunda vertente do trabalho, deu-se especial atenção aos seguintes aspetos:

- Investigar se a diversidade genética influencia a capacidade invasiva da *L. pneumophila*, utilizando diferentes estirpes de *L. pneumophila* para infetar *A. castellanii*.
- Analisar alterações na expressão génica da *L. pneumophila* após co-cultura em *A. castellanii*, utilizando uma técnica de PCR em tempo real.



## Capítulo 2 – Estudo da Epidemiologia da Doença dos Legionários em Portugal, 1987 – 2016

O presente capítulo é dedicado ao estudo da epidemiologia da DL em Portugal, com particular ênfase na tipificação da população de *L. pneumophila*, a espécie responsável pela maioria dos casos de doença.

No trabalho é utilizada a nomenclatura aprovada pelos membros do *European Study Group on Epidemiological Markers* (289):

Isolado - população de bactérias em cultura pura derivada de uma única colónia;

Estirpe – um isolado ou grupo de isolados que exibem o mesmo fenótipo e/ou genótipo, o que o distingue de outros isolados da mesma espécie.

### 2.1 Material e métodos

#### 2.1.1 Amostra em estudo

No total foram analisados 205 isolados de *Legionella*, dos quais 178, obtidos de doentes com formas graves de DL (isolados clínicos) e 27, isolados de amostras ambientais (isolados ambientais).

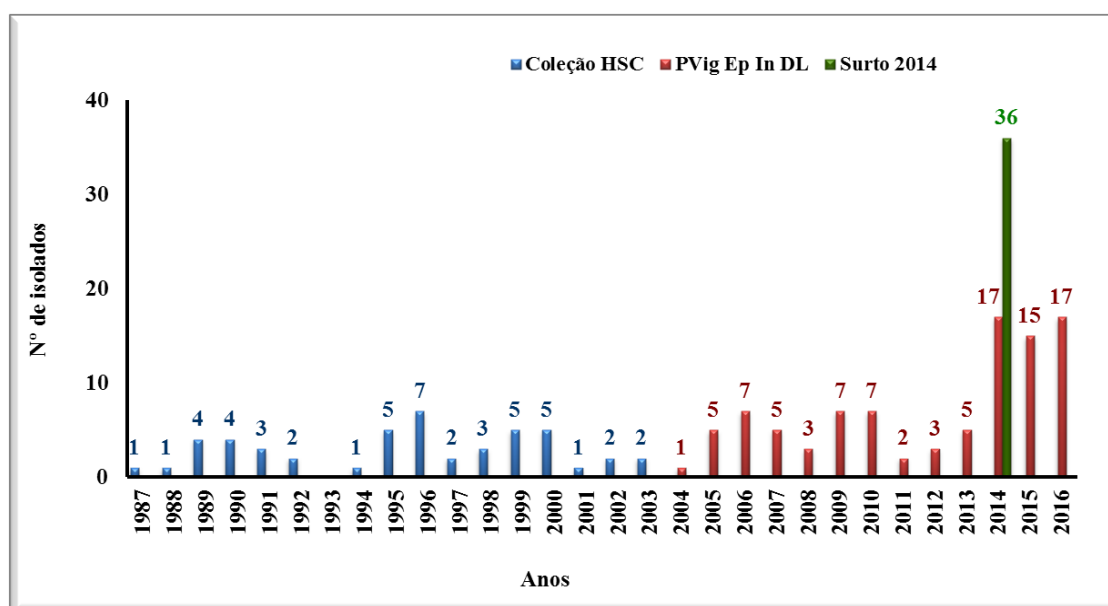
Os isolados foram preservados a -80°C em dois meios diferentes, tioglicolato (Merck) com 15% de glicerol (Merck) e em *skim milk* (Applichem), (Anexo VIII).

Nas culturas utilizaram-se placas de BCYE- $\alpha$  preparadas no laboratório (CYE agar e BCYE suplementos, Oxoid), (Anexo VIII).

Todos os ensaios foram realizados a partir de culturas com 48h de incubação a 37°C.

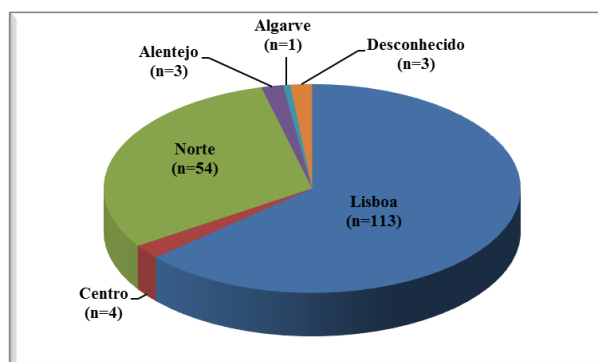
##### 2.1.1.1 Isolados clínicos

Dos 178 isolados clínicos, 48 foram recuperados entre 1987 e 2003 e fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz (Profª Doutora Teresa Marques). Os restantes 130 isolados foram recuperados dos 1807 casos reportados ao PVig Ep In da DL, entre 2004 e 2016 (Figura 5 e Anexo I).



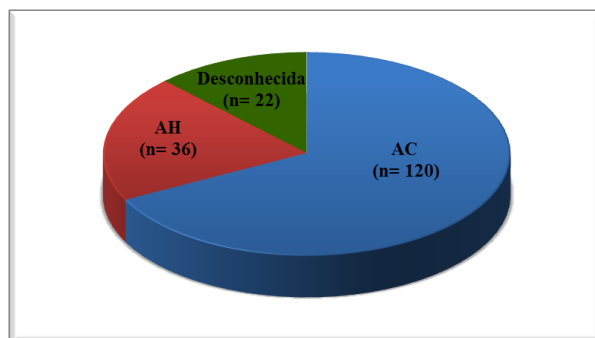
**Figura 5** – Distribuição dos isolados clínicos pelo período em análise, 1987 a 2016 (n=178).

Os isolados clínicos foram enviados de hospitais portugueses das cinco NUTS (Unidades Territoriais para Fins Estatísticos) de Portugal continental (Figura 6).



**Figura 6** – Distribuição dos isolados clínicos pelas cinco NUTS de Portugal continental.

Dos isolados clínicos recolhidos de infeções adquiridas no hospital, 35 são provenientes de um hospital da área de Lisboa (HospA), onde se registaram pequenos surtos e alguns casos esporádicos de DL de origem hospitalar, durante o período de 1987 a 2007. O outro isolado foi recuperado num hospital da região norte (HospB), em 2011, no decurso de um pequeno surto. Dos 120 isolados clínicos recuperados de infeções adquiridas na comunidade, cinco estão associados a dois surtos em duas cidades do norte de Portugal, um em 2009 e outro em 2012, sendo que dos restantes, 36 foram recuperados de um surto que se verificou na região de Lisboa em 2014 (Figura 7).

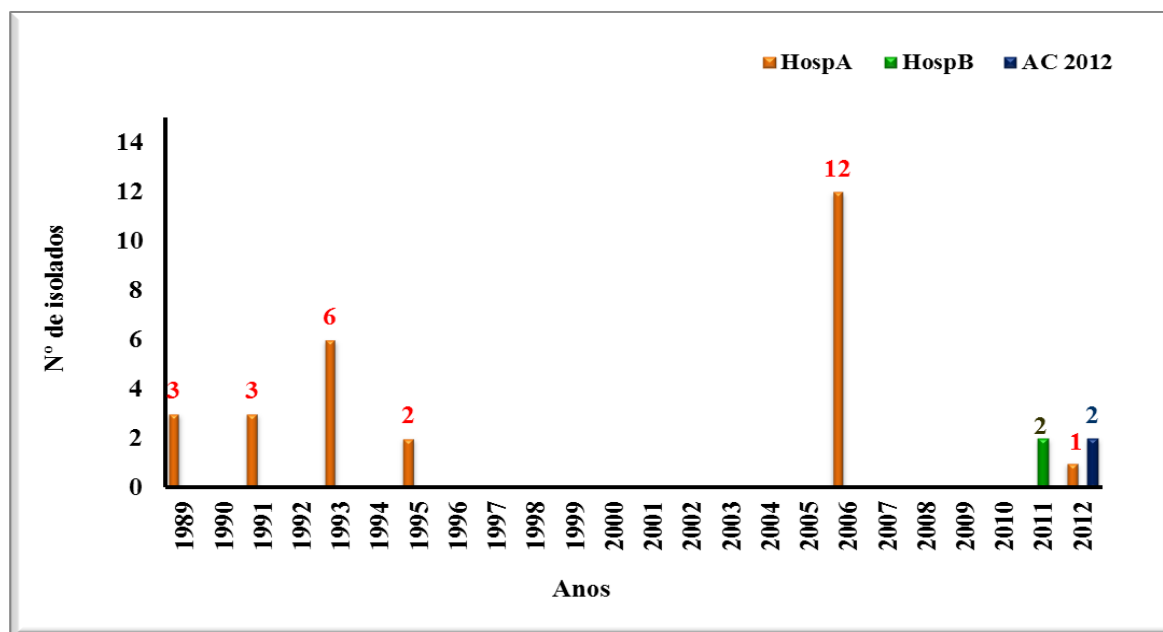


**Figura 7** – Distribuição dos isolados clínicos quanto à origem da infeção.  
AH – Infeção adquirida no hospital; AC – Infeção adquirida na comunidade

A média de idades dos doentes (129 homens e 36 mulheres) situou-se em 56 e 61 anos, respetivamente para homens e mulheres (intervalo: 13 a 92 anos). Em 24 doentes a idade é desconhecida e em 13 o sexo é desconhecido.

#### 2.1.1.2 Isolados ambientais

Dos 31 isolados ambientais, 27 foram recuperados de amostras recolhidas no sistema de distribuição de água do HospA (SDHA) entre 1989 e 2012. Dos restantes isolados duas amostras são provenientes do sistema de abastecimento de água do HospB e duas da investigação ambiental do surto da comunidade de 2012 (AC2012).



**Figura 8** – Distribuição dos isolados ambientais recuperados no período de 1989 a 2012 (n=27)

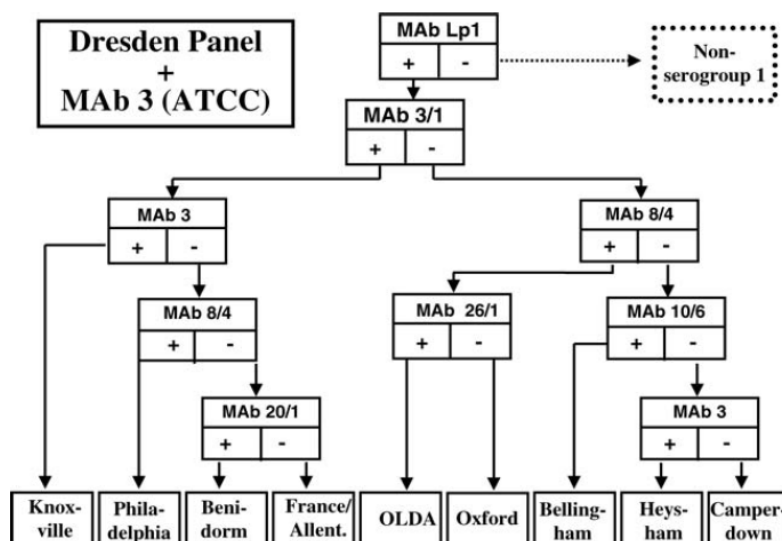
AC (Isolados ambientais recolhidos durante a investigação de um surto de infeção adquirida na comunidade em 2012).

## 2.1.2 Tipificação dos isolados responsáveis por infeção humana em Portugal, 1991 - 2016

Na tipificação dos 143 isolados clínicos e quatro isolados ambientais utilizaram-se as duas metodologias atualmente preconizadas pelo EWGLI, os MAb's do painel de Dresden e o SBT.

### 2.1.2.1 Anticorpos monoclonais (MAbs - painel Dresden)

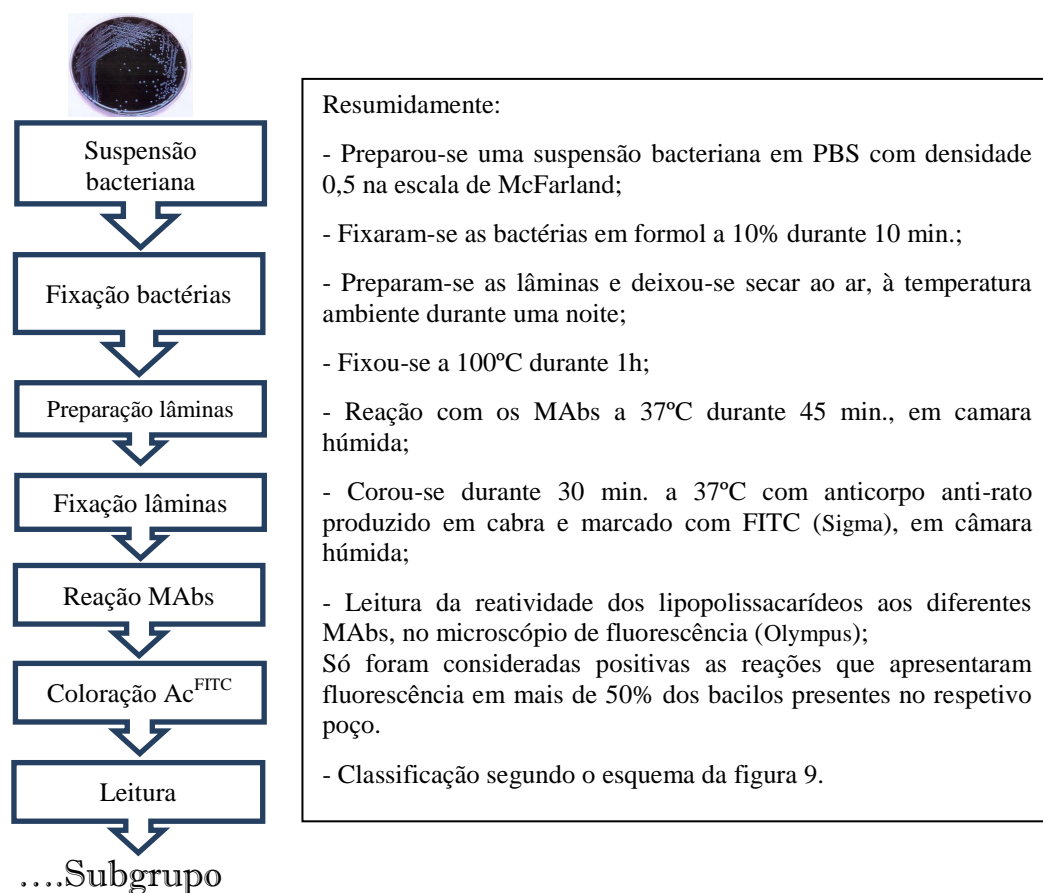
As diferenças antigénicas dos isolados foram identificadas utilizando os MAb's do painel de Dresden, segundo o protocolo de Helbig e colaboradores (135). O painel de Dresden identifica 15 dos 16 serogrupos da *L. pneumophila* utilizando MAb's específicos de serogrupo. Dentro do sg1, este esquema de tipificação permite diferenciar nove subgrupos usando sete MAb's, MAb Lp1, MAb3/1, MAb8/4, MAb10/6, MAb20/6, MAb26/1 e o MAb3 obtido do painel internacional (Figura 9).



**Figura 9** - Esquema de tipificação utilizando o painel de Dresden (135)

Os MAb's do painel de Dresden foram utilizados para tipificar 142 isolados *L. pneumophila* sg1 (138 clínicos e quatro ambientais) e a sua execução compreendeu sete fases (figura 10).





**Figura 10** – Algoritmo de tipificação utilizando os MAbs do painel Dresden

Esta tarefa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Hospital Egas Moniz do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental.

#### 2.1.2.2 Tipificação baseada em sequências (SBT)

As diferenças genéticas foram avaliadas utilizando o esquema de SBT, segundo o protocolo padronizado pelo EWGLI e disponível em:

[http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php).

Este esquema baseou-se na sequenciação de fragmentos internos de sete genes *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* e *neuA*, variando a zona de análise entre 182 e 473 bp (Tabela 1).

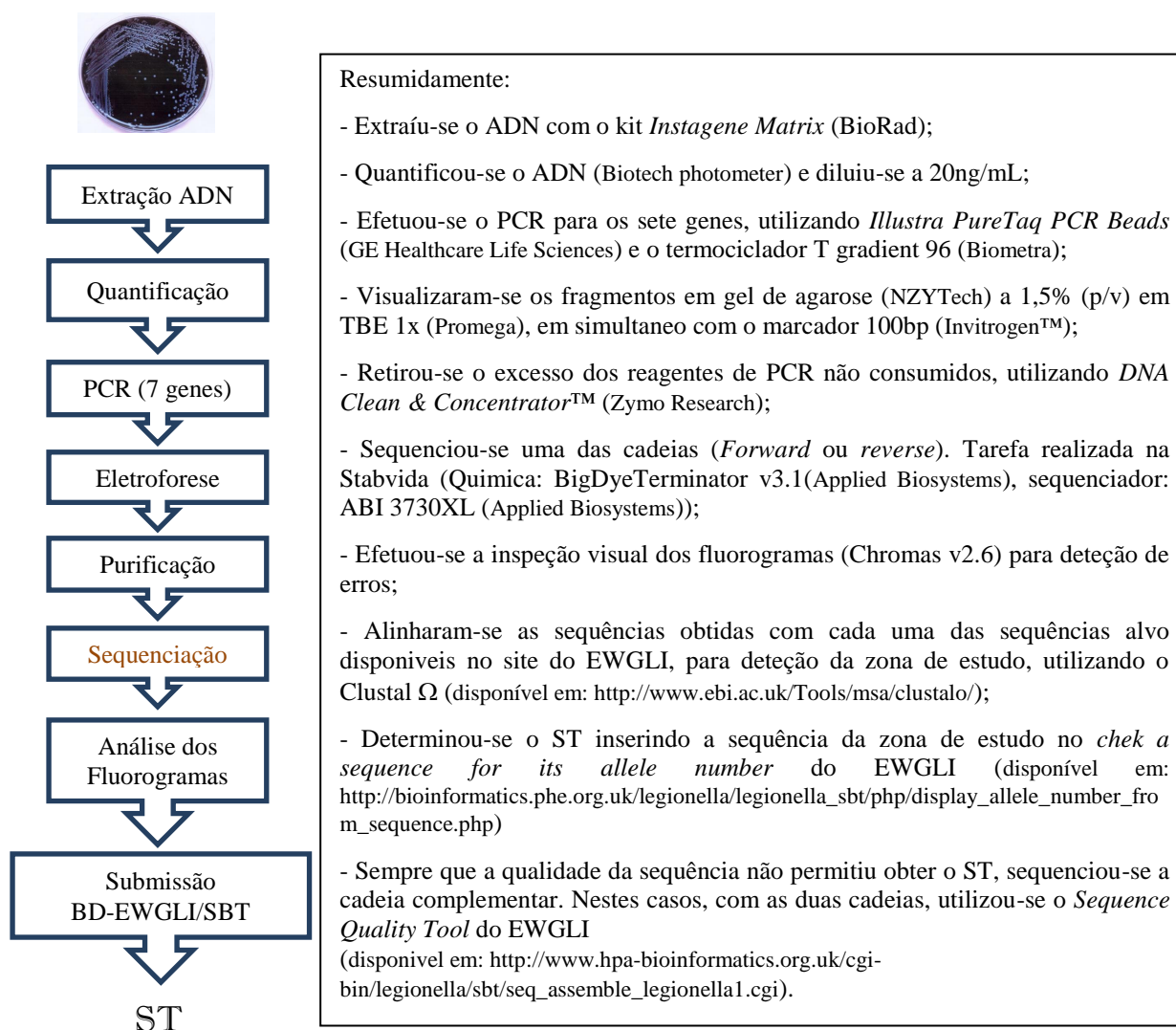
Para cada um dos *locus* em estudo é obtido um número alélico, após a submissão das sequências à base de dados criada pelo EWGLI (disponível na página acima referida). A combinação dos sete números alélicos define uma sequência tipo (ST).

Quando os *primers* padrão para o *neuA* não amplificaram, foi usado outro par de *primers*, *neuAh*, especificamente desenhados para o gene homólogo (*neuAh*). Este gene está presente em alguns isolados pertencentes a outros serogrupos que não o sg1 e é funcionalmente equivalente ao gene *neuA* da estirpe Philadelphia-1.

**Tabela 1-** Identificação das zonas de análise em cada um dos *locus* estudados no esquema SBT

	Gene	Produto PCR (bp)	Sequência de referência	Zona alvo
Esquema padrão	<i>flaA</i>	245	X83232	653-834
	<i>pilE</i>	459	AF048690	102-435
	<i>asd</i>	575	AF034213	538-1010
	<i>mip</i>	558	AJ496269	117-518
	<i>mompS</i>	648	AF078136	523-874
	<i>proA</i>	480	M32884	1134-1538
	<i>neuA</i>	459	AJ007311	229-582
	<i>neuAh</i>	771	FR750546	229-579

O SBT foi utilizado para tipificar 147 isolados *L. pneumophila* (143 clínicos e quatro ambientais) e a sua realização envolveu oito fases diferentes (Figura 11).



**Figura 11** – Algoritmo de tipificação utilizando o protocolo SBT

Após a tipificação com os MABs do painel de Dresden e o SBT, os resultados foram agrupados de forma a determinar a estrutura da população de *L. pneumophila* que em Portugal provocou DL no período em análise. Recorrendo à BD-EWGLI/SBT foram identificados as estirpes que são específicas de Portugal, por comparação com os reportados por outros países.

Todos os resultados obtidos foram inseridos na referida base de dados.

### **2.1.3 Tipificação dos isolados de um hospital da área de Lisboa, 1987-2012**

Entre 1987 e 2012, um total de 58 isolados de *Legionella* foram recuperados num único hospital da área de Lisboa (HospA). Destes, 35 são isolados clínicos recuperados dos 57 casos de DL adquirida no hospital (DLAH) e 23 são isolados ambientais recolhidos durante as investigações ambientais subjacentes. Os casos de infeção ocorreram como pequenos surtos ou como casos esporádicos durante o período de 1986 a 2007. No estudo destes isolados utilizaram-se quatro métodos de tipificação: MABs, SBT (já anteriormente descritos), WGS e AFLP.

#### **2.1.3.1 Polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP)**

O protocolo de AFLP utilizado neste estudo foi o padronizado pelo EWGLI (Fry e col., 2000).

A identidade ou perfil dos isolados (AFLP-tipo) foi obtida após a análise do padrão de bandas obtido em gel de agarose, no *BioNumerics*. O primeiro passo consistiu na normalização dos géis e na definição da tolerância admitida para o posicionamento das bandas, tendo-se utilizado uma percentagem de 2%. O tamanho dos fragmentos gerados foi obtido por comparação com o perfil do marcador de peso molecular aplicado no mesmo gel. Para a identificação do AFLP-tipo, na base de dados criada pelo EWGLI, só foram considerados os fragmentos com tamanho superior a 300 bp e inferior a 3500 bp. Após a submissão dos diferentes pesos moleculares à base de dados, era identificado o AFLP-tipo que apresentava maior percentagem de semelhança com o padrão de bandas do isolado em estudo.

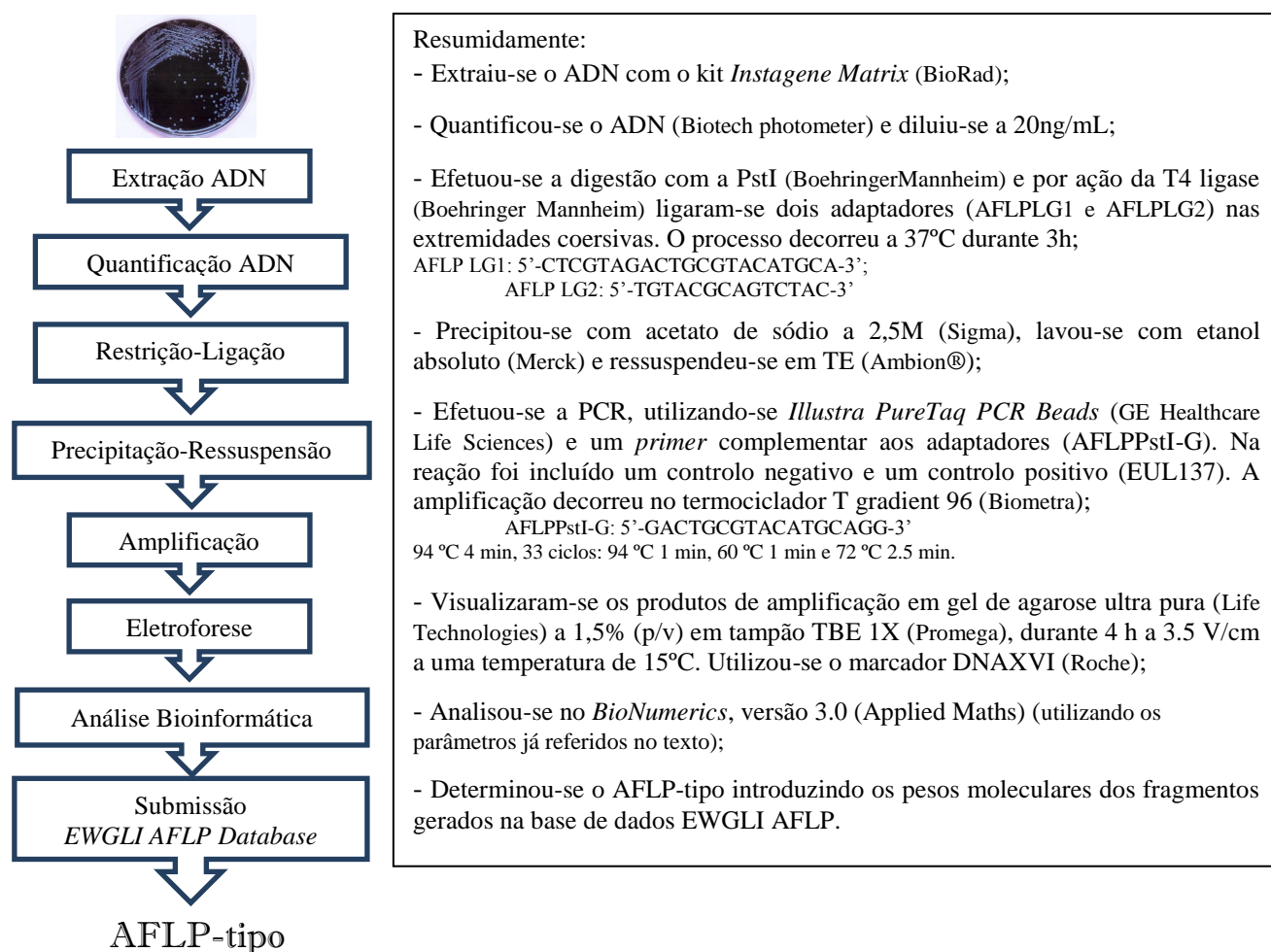
A base de dados disponível em <http://www.ewgli.org> (atualmente já desativada) era constituída por 31 AFLP-tipo obtidos pela análise de 130 estirpes representativas dos isolados europeus, na tabela 2 apresentam-se os 16 AFLP-tipo mais reportados.

Para validar os resultados e assegurar a reprodutibilidade dos perfis de bandas em cada ensaio, juntava-se aos isolados em estudo a estirpe EUL137. A estirpe pertence à coleção do EWGLI e foi distribuída pelos laboratórios colaboradores do grupo europeu durante os ensaios de avaliação da *performance* do método, para ser utilizada como controlo. O padrão de bandas da EUL137 estava bem definido (AFLP-tipo = 015 Dresden 137) e era reprodutível desde que aplicado o protocolo padronizado do AFLP.

**Tabela 2** – Identificação dos 16 AFLP-tipo mais reportados à base de dados (101)

EWGLI AFLP tipo	Origem do isolado
001Lugano	Suíça
002Lugano	Suíça
003Glasgow	Escócia
004Lyon	França
005Rome	Itália
006Copenhagen	Dinamarca
007Copenhagen	Dinamarca
008Stockholm	Suécia
009London	Inglaterra e PaísGales
010London	Inglaterra e PaísGales
011Madrid	Espanha
012Rome	Itália
013London	Inglaterra e PaísGales
014London	Inglaterra e PaísGales
015Dresden	Inglaterra e PaísGales
016Madrid	Espanha

O AFLP foi utilizado para tipificar 69 isolados (33 isolados clínicos e 12 isolados ambientais do HospA, e 24 isolados não relacionados), a sua execução compreendeu oito fases (Figura 12).



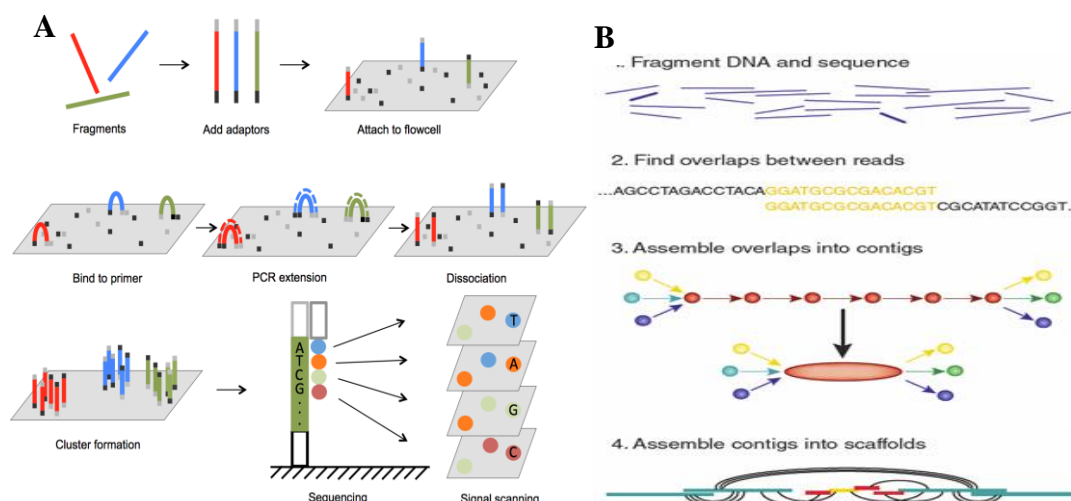
**Figura 12** – Algoritmo de tipificação utilizando o protocolo AFLP

### 2.1.3.2 Sequenciação total do genoma (WGS)

Este método permite a sequenciação simultânea de milhões de fragmentos de ADN, variando o procedimento segundo a plataforma utilizada. Trata-se de um método laborioso que culmina com a análise das múltiplas sequências (*reads*) obtidas, o que inevitavelmente requer o recurso à bioinformática. Tem a grande vantagem de permitir um elevado nível de discriminação, uma vez que possibilita a análise de virtualmente 100% do genoma. Esta característica faz da WGS um excelente método para a investigação de surtos, de que são exemplo os estudos realizados com isolados do surto de Vila Franca de Xira, da reanálise dos isolados do surto de Filadélfia e de um surto num hotel em Calpe, Espanha (17, 206, 257, 264).

De forma geral e sucinta, o processo de WGS no sistema da *Illumina* (MiSeq) utilizado no presente trabalho começa com a criação de uma biblioteca, o que envolve a fragmentação aleatória do ADN em pequenas sequências e ligação de dois oligonucleótidos diferentes (adaptadores) às extremidades 5' e 3'. Segue-se a hibridização dos fragmentos da biblioteca a uma matriz sólida (*flow cell*) e posterior amplificação. No final, formam-se grupos de cadeias complementares à sequência original (Figura 13A), as quais são sequenciadas como no método de Sanger, por terminação cíclica (embora aqui de forma reversível), isto é, incorporação de nucleótidos terminadores marcados com diferentes fluoróforos que impedem a ligação de novas bases (193).

A análise bioinformática (detalhada na próxima secção) dos *reads* que foram produzidos em grande quantidade permite, por fim, reconstruir a sequência original do ADN do isolado em estudo (através da sobreposição dos *reads* - *de novo assembly*), (Figura 13B) e inferir relações filogenéticas entre os vários isolados bacterianos.



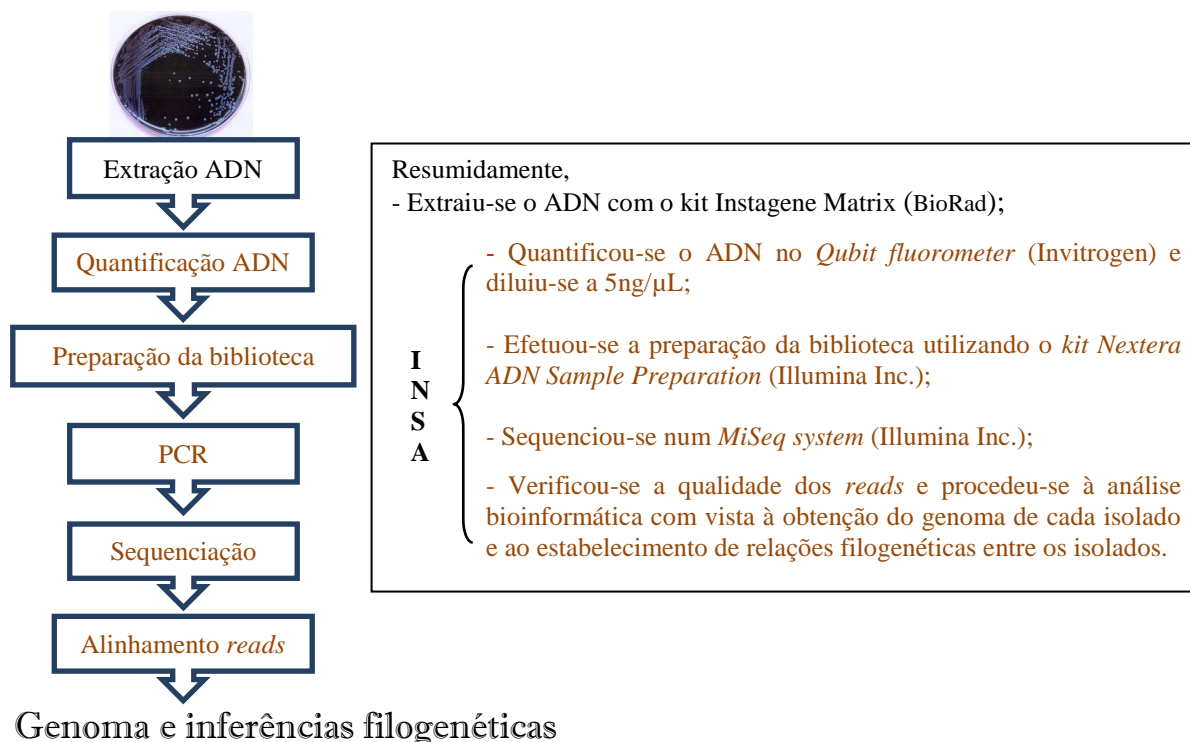
**Figura 13. A** - Esquematização da tecnologia *Illumina*

(fonte: <http://www.intechopen.com/books/mostdownloaded/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges>),

**B** – Esquema do alinhamento “de novo” *assembly*

(fonte: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v9/n4/images/nmeth.1935-I2.jpg>)

A WGS foi utilizada para tipificar 49 isolados recuperados do HospA (31 clínicos e 18 ambientais) e a sua realização compreendeu 6 fases, todas à exceção da extração foram realizadas no INSA, a última fase da análise foi realizada em colaboração (Figura 14).



**Figura 14** – Algoritmo da tipificação utilizando WGS (tecnologia *Illumina*)

### 2.1.4 Tipificação diretamente de amostras clínicas

A avaliação das diferenças genéticas com o esquema de SBT exige um isolado em cultura pura. Este facto aumenta o tempo de resposta e em algumas situações limita a realização da tipificação, dado que, como já foi referido anteriormente, a bactéria tem crescimento fastidioso e necessidades nutricionais específicas, não crescendo nos meios habitualmente utilizados no laboratório de microbiologia. Por esta razão nem todos os laboratórios estão aptos a realizar a cultura de *Legionella*.

#### 2.1.4.1 Método de *nested*-SBT

No método de *nested*-SBT, utiliza-se um protocolo aproximado ao do SBT, isto é, sequenciam-se as mesmas zonas alvo, embora utilizando uma amostra e um processo diferente de amplificação dos sete genes.

Neste método utiliza-se ADN obtido diretamente de amostras respiratórias e a amplificação é realizada através de uma técnica de *nested*-PCR.

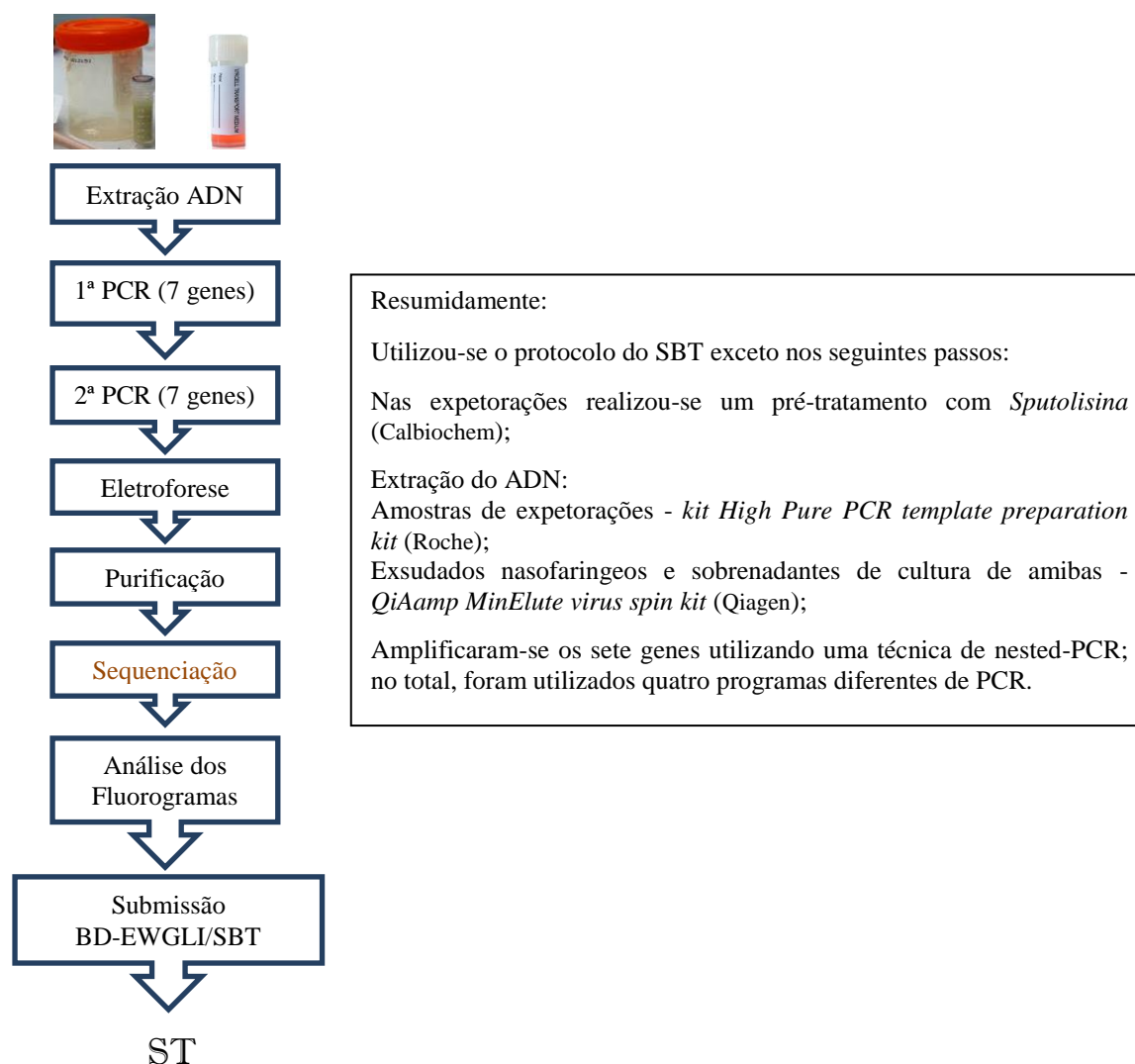
Na *nested*-SBT amplifica-se na primeira fase uma zona externa às regiões alvo do SBT e na segunda utiliza-se um protocolo semelhante para os *locus* *pile*, *proA* e *neuA*. As alterações em

relação ao protocolo do SBT verificam-se nos *locus* flaA e *mompS*, utilizam primers *reverse* diferentes, e nos *locus* *asd* e *mip*, utilizam protocolos de amplificação distintos (114).

No presente trabalho, para a realização deste método, utilizou-se o protocolo *NESTED Sequence-Based Typing (SBT) protocol for epidemiological typing of Legionella pneumophila directly from clinical samples, version 2.0* disponível em:

[http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/protocols/ESGLI%20NESTED%20SBT%20GUIDELINE%20v2.0.pdf](http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/protocols/ESGLI%20NESTED%20SBT%20GUIDELINE%20v2.0.pdf).

O método foi aplicado a nove amostras respiratórias, que foram positivas para *Legionella* spp e *L. pneumophila* por PCR em tempo real, utilizando o gene 16S do ARNr e *mip*, respetivamente. As nove amostras foram colhidas em contextos diferentes: três expetorações em doentes com pneumonia e seis exsudados nasofaríngeos em utentes de lares da 3ª idade com infeção respiratória (projeto GERIA). Foi igualmente aplicada a dois sobrenadantes de cultura de amibas inoculadas com secreções respiratórias (Figura 15).



**Figura 15** – Algoritmo de tipificação utilizando o protocolo nested-SBT

### 2.1.5 Análise dos dados

Numa primeira fase analisou-se o desempenho dos métodos MAbS (painel de Dresden), AFLP e SBT no estudo da epidemiologia da Doença dos Legionários em Portugal (1987–2016), com base nos seguintes parâmetros: capacidade de tipificação, reprodutibilidade, poder discriminante, concordância epidemiológica, recursos técnicos exigidos, rapidez e facilidade de execução e interpretação dos resultados (289). Numa segunda fase analisou-se a congruência dos resultados obtidos com os três métodos de tipificação. E por último as relações entre os STs obtidos por SBT.

O poder discriminante foi avaliado recorrendo ao índice de diversidade de *Simpson* (IDS), que indica a probabilidade de duas estirpes retiradas ao acaso de uma população pertencerem a dois tipos diferentes. O valor varia entre 0 e 1, em que 0 significa que os isolados são todos iguais e 1 que o método distinguiu todos os isolados (127). No caso específico do SBT, avaliou-se o desempenho global do método e de cada um dos genes em particular. A congruência dos resultados obtidos com os três métodos foi avaliada pelo coeficiente ajustado de Wallace (CAW), com intervalo de confiança de 95%. Este coeficiente indica a probabilidade de dois isolados classificados como idênticos por um método, o serem também por um outro método. Valores altos de CAW, isto é, próximos de 1, indicam que a utilização dos dois métodos é redundante (261). Ambos os cálculos foram efetuados com um calculador disponível em <http://www.comparingpartitions.info/index.php?link=Tut12>.

A relação filogenética entre os STs obtidos pelo método de SBT foi avaliada recorrendo ao algoritmo *goeBURST* (93) disponível em: <https://online.phyloviz.net/index>. Os complexos clonais (CCs) foram definidos com base nos STs que apresentam variação num único locus (SLV), isto é, partilham seis dos setes alelos e o fundador como o ST com mais SLVs. STs que não foram associados a nenhum CC são considerados *singletons* (87). Na definição do fundador utilizaram-se 1000 réplicas de *bootstrap*.

Os dados de WGS obtidos para cada isolado de *L. pneumophila* foram sujeitos a um conjunto de análises bioinformáticas com vista essencialmente a: i) reconstruir e comparar as sequências obtidas dos genomas; e, ii) inferir as dinâmicas evolutivas da estirpe do ST100 e as relações filogenéticas entre os vários isolados bacterianos em estudo.

Numa primeira fase, foi avaliada e melhorada a qualidade dos *reads* com o recurso às aplicações bioinformáticas *FastQC* versão 0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e *Trimmomatic* versão 0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), respetivamente. De seguida, os *reads* de elevada qualidade foram aplicados para reconstruir as sequências do genoma de cada isolado através de “*de novo assembly*” com recurso ao programa *SPAdes* (version 3.7.1) (<http://bioinf.spbau.ru/spades>), tendo-se usado uma cobertura média por nucleótido de



aproximadamente 64 vezes. As sequências obtidas dos genomas (isto é, o conjunto de sequências contíguas - *contigs* – que representam a totalidade do genoma) foram posteriormente alinhadas através do *software MAUVE* versão 2.3.1 (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>), com vista à pesquisa de regiões genómicas que não fossem partilhadas (o denominado “genoma acessório”) por todos os isolados do ST100 sob avaliação. Deleções detetadas no genoma de alguns isolados foram posteriormente confirmadas através do alinhamento dos *reads* originais contra a sequência do seu genoma usando o programa bioinformático *Bowtie2* versão 2.1.0 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). Adicionalmente, utilizaram-se também as ferramentas bioinformáticas *Harvest tools* versão 1.1.2 (<http://harvest.readthedocs.io/>) por forma a integrar os genomas dos isolados do ST100 na diversidade genética da espécie *L. pneumophila*. Neste sentido, foram comparadas as regiões genómicas partilhadas (o denominado “core-genoma”) entre estes isolados e isolados representativos da diversidade da espécie, selecionadas de Underwood e colaboradores e de Borges e colaboradores (17, 285), (Anexo V).

Numa segunda fase, procedeu-se à análise fina da microevolução e diversidade genética da estirpe ST100 através do escrutínio bioinformático de mutações pontuais (SNPs) que discriminam os vários isolados em estudo. Para isso, os *reads* de cada isolado foram alinhados contra a mesma sequência de “referência” usando a ferramenta bioinformática Snippy versão 3.1 (<https://github.com/tseemann/snippy>), a qual permite listar as SNPs obtidas para cada isolado e, posteriormente, gerar um alinhamento com todas as posições nucleotídicas ( $n = 152$ ) do core-genoma informativas filogeneticamente (o denominado alinhamento de *core* SNPs), isto é, posições que discriminam os genomas sob comparação (excluem-se regiões recombinantes). Com vista a aumentar o poder discriminatório, foi usada como sequência de referência a sequência do genoma de um isolado de *L. pneumophila* em estudo (em concreto, o isolado Pt-HSC1-87 recolhido em 1987). O alinhamento de *core* SNPs foi seguidamente analisado usando a ferramenta bioinformática *MEGA5* (<http://www.megasoftware.net/>) com vista a gerar matrizes de distâncias nucleotídicas entre os isolados e árvores filogenéticas usando o método de “*Neighbor-joining*” com *bootstrap* (1000 réplicas). A aplicação *Microreact* (<https://microreact.org/>) foi subsequentemente usada para melhor representar a relação entre a cronologia de isolamento de *L. pneumophila* e ao grau de diversificação genética. Para o mesmo efeito, aplicou-se, ainda, a ferramenta *PHYLOViZ online* (<https://online.phyloviz.net./index>) para construir *goeBURST full minimum spanning trees* (MST) com base em matrizes de distâncias entre os isolados.

**Resumo da análise bioinformática:**

Reconstrução das sequências dos genomas:

- Avaliação e melhoria da qualidade dos *reads* (*FastQC* e *Trimmomatic*);
- Reconstrução dos genomas de *L. pneumophila* por “*de novo assembly*” (*SPAdes*);
- Pesquisa de genoma acessório (*MAUVE* e *Bowtie2*);
- Integração dos genomas dos isolados do ST100 na diversidade genética da espécie *L. pneumophila* (*Harvest tools*);

Análise das dinâmicas evolutivas da estirpe ST100 e das relações filogenéticas:

- Escrutínio de todas as posições nucleotídicas informativas filogeneticamente (*Snippy*);
- Avaliação de matrizes de distâncias e reconstrução filogenética (*MEGA5*);
- Estabelecimento de relações entre a cronologia de isolamento e o grau de diversificação genética (*Microreact* e *PHYLOViZ*).

## **2.2 Resultados**

### **2.2.1 Tipificação dos isolados responsáveis por infeção humana em Portugal, 1991 - 2016**

Foram analisados os isolados da coleção do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz recuperados de doentes com infeções da comunidade e todos os isolados enviados pelo PVig Ep In da DL, com exceção dos oito isolados do HospA, num total de 143 isolados (Anexo D).

#### **2.2.1.1 Anticorpos monoclonais (MAbs)**

Em todos os isolados testados foi possível obter um resultado, ou seja, a capacidade de tipificação pelos MAbs foi de 100%. Com os MAbs, os 138 isolados pertencentes ao sg1 reagiram com um ou mais MAbs e, de acordo com o algoritmo da figura 9, foi possível a associação a um subgrupo.

No que se refere à reprodutibilidade, esta foi de 100%, com os resultados das repetições (n=20) idênticos. Estes ensaios serviram também para avaliar a concordância das leituras entre dois operadores diferentes.

Quanto à concordância epidemiológica, no grupo de estudo tipificaram-se 41 isolados epidemiologicamente relacionados, provenientes de três surtos da comunidade, verificando-se que em todos existiu concordância nos resultados.

O método apresentou-se de fácil execução, não requerendo equipamento diferenciado e permitiu a obtenção de resultados ao fim de aproximadamente 48h, depois de obtida a cultura pura.

#### **Tipificação fenotípica dos isolados, 1991 - 2016**

Considerando a origem da infeção, a maioria dos isolados em estudo são da comunidade, só existindo um isolado recuperado num surto hospitalar ocorrido no HospB. Dos 143 isolados clínicos em estudo, todos pertencem à espécie *L. pneumophila*, dos quais 138 ao sg1 e cinco a outros serogrupos (sg8, sg10, sg12, sg14); houve um isolado em que não foi possível realizar a reação com os MAbs específicos de serogrupo, pelo que foi classificado como 2-14 pela aglutinação com partículas de latex revestidas, *kit Legionella Latex Teste* (Oxoid). Dos isolados pertencentes ao sg1, só três não possuem o epítipo de virulência reconhecido pelo MAb 3/1, dois pertencem ao subgrupo OLDA e o outro ao Bellingham (tabela 3). Dos que reagiram com este MAb, 59 pertencem ao subgrupo France/Allentown, 41 ao Knoxville, 27 ao Philadelphia e oito ao Benidorm.

### **2.2.1.2 Tipificação baseada em sequências (SBT)**

Com o SBT foi possível obter um resultado com todos os isolados testados, seguindo os critérios de validação específicos. Cada produto de PCR tem um tamanho definido (tabela 1), facilmente mensurável por eletroforese, pelo que a capacidade de tipificação foi de 100%. Como referido na introdução, o gene *neuA* não está presente em alguns isolados pertencentes a outros serogrupos que não o sg1, pesquisando-se nesses casos o homólogo. Na população em estudo (n=143), esta situação ocorreu em quatro isolados, verificando-se nesses casos a amplificação com o par de *primers* para o gene homólogo, *neuAh*.

O método foi reprodutível (100%), uma vez que nos 41 isolados relacionados obteve-se sempre o mesmo resultado. Quanto à rapidez e facilidade de execução, verificou-se que depois da obtenção da cultura pura e contando com as 48h (em média o tempo para ter o resultado da sequenciação), os resultados do SBT foram obtidos entre 96h a 120h.

### **Tipificação genotípica dos isolados, 1991-2016**

Todos os isolados do sg1 e do sg12 (n=139) foram tipificados utilizando o esquema padrão do SBT (tabela 1). Os restantes quatro isolados (sg8, sg10, sg14 e sg2-14) falharam a amplificação com os *primers* do gene *neuA*, sendo que nestes isolados o ST foi atribuído utilizando os *primers* para o *neuAh*. No total detetaram-se 37 STs diferentes (tabela 3), 14 dos quais foram descritos pela primeira vez no decurso do presente estudo (ST98, ST101, ST102, ST173, ST174, ST785, ST1009, ST1343, ST1383, ST1384, ST1905, ST1910, ST2152, ST2184) e que até ao momento da escrita da presente tese, continuam a só ter sido reportados à BD-EWGLI/SBT por Portugal. No total, estes 14 STs incluem 44% (63/143) dos isolados estudados. O ST com maior número de isolados (n=39) é o ST1905 e inclui os 36 isolados recuperados durante o surto de Vila Franca em 2014 e três isolados de 2015, estes provenientes de infeções adquiridas na comunidade na região de Lisboa. Três destes novos STs foram detetados em três dos cinco isolados de *L. pneumophila* não sg1 (ST1343, ST1383, ST1384). Foram ainda identificados oito novos números alélicos que foram submetidos e confirmados pelos responsáveis da BD-EWGLI/SBT, n°22 e n°29 para o *locus mip*, n°24 e n°37 para o *locus pilE* e n°20, n°34, n°23 e n°219, respetivamente para os *locus asd*, *mompS*, *proA* e *neuAh*. Curiosamente, dois dos novos STs (ST1383 e ST1384) estão associados a dois isolados *L. pneumophila* não sg1 que apresentam no seu genoma, respetivamente, cinco e seis destes novos alelos. Ambos os isolados foram recuperados na região de Lisboa, um em 1991 e outro em 2016 (isolado idêntico a um outro recuperado no HospA em 1990, ver 2.2.2).

Dos restantes perfis, os ST44 e ST23 são o segundo e o terceiro mais prevalentes na população em estudo com, respetivamente, 12 e 11 isolados. Dezassete dos 37 STs só foram associados a um isolado (Tabela 3).

**Tabela 3** – Variabilidade dos isolados clínicos de *L. pneumophila*, 1991 - 2016, aplicando os métodos de tipificação SBT e MAb (painel de Dresden), (n=143).

SBT			MAbs (Dresden panel)			Relação epidemiológica
ST <sup>a</sup>	Perfil alélico <sup>b</sup>	Nº isolados	Sg	Subgrupo	Nº isolados	
<b>1905</b>	11,14,16,10,15,13,2	39	1	France/Allentown	39	Sim (36 das 39) <sup>c</sup>
44	4,8,11,10,10,12,2	12	1	France/Allentown	9	Sim (2 das 12) <sup>d</sup>
				Philadelphia	2	
23	2,3,9,10,2,1,6	11	1	Philadelphia	2	Não
				Knoxville	8	
				France/Allentown	1	
				France/Allentown	2	
62	8,10,3,15,18,1,6	6	1	Philadelphia	1	Não
				Knoxville	2	
				Benidorm	1	
				Benidorm	1	
20	2,3,18,15,2,1,6	6	1	Knoxville	6	Não
<b>98</b>	8,10,3,10,2,5,6	5	1	Philadelphia	1	Não
				France/Allentown	4	
99	4,8,11,5,29,12,10	5	1	Knoxville	5	Não
103	1,4,3,22 <sup>b</sup> ,1,1,1	5	1	Philadelphia	5	Não
37	3, 4, 1, 1, 14, 9, 11	4	1	Philadelphia	4	Não
42	4,7,11,3,11,12,9	4	1	Benidorm	3	Não
				Knoxville	1	
94	12,8,11,5,20,12,2	4	1	Knoxville	4	Não
436	12,17,11,15,5 12,20	4	1	Philadelphia	4	Não
<b>785</b>	6,37,15,15,21,10,9	4	1	Knoxville	4	Sim (3 das 4) <sup>e</sup>
<b>101</b>	6,10,15,15,21,4,6	3	1	Knoxville	2	Não
				France/Allentown	1	
16	2,10,18,10,2,1,9	3	1	Knoxville	3	Não
1	1,4,3,1,1,1,1	3	1	Olda	2	Não
				Philadelphia	1	
22	2,3,6,10,2,1,6	2	1	Philadelphia	2	Não
146	2,10,18,10,2,1,6	2	1	Philadelphia	2	Não
<b>173</b>	6,10,14,15,21,4,6	2	1	Knoxville	2	Não
435	2,10,18,15,2,1,6	2		Knoxville	2	Não
<b>1384</b>	<b>2,24,20,29,34,23,219</b>	1	2-14	n.a.	1	
48	5,2,22,27,6,10,12	1	1	Bellingham	1	
65	12,8,11,5,29,12,6	1	1	Benidorm	1	

Tabela 3 - continuação

SBT			MAbs (Dresden panel)		
ST <sup>a</sup>	Perfil alélico <sup>b</sup>	Nº Isolados	Sg	Subgrupo	Nº isolados
75	2,3,18,13, 25,5,6	1	1	France/Allentown	1
96	2,3,6,10,2 1,9	1	1	Benidorm	1
<b>102</b>	8,19,5,15,18,5,10	1	1	Philadelphia	1
<b>174</b>	4,8,11,5,10,12,15	1	1	France/Allentown	1
728	2,10,3,28,9,4,3	1	12	n.a.	1
744	2,3,5,5,18,1,10	1	1	Benidorm	1
<b>1009</b>	3,13,1,17,14,9,9	1	1	Benidorm	1
1010	12,10,3, 10,18,1,6	1	1	Philadelphia	1
1324	5,1,22,30,6,10,203	1	8	n.a.	1
<b>1343</b>	6,10,21,28,4,14,207	1	10	n.a.	1
<b>1383</b>	3,24,1,29,34,23,219	1	14	n.a.	1
<b>1910</b>	8,8,3,15,18,1,37	1	1	Philadelphia	1
<b>2152</b>	21,14,28,5,15,29,10	1	1	Knoxville	1
<b>2184</b>	21,14,28,10,15,29,6	1	1	Knoxville	1

<sup>a</sup> A negrito os números alélicos e novos STs;

<sup>b</sup> Sequência dos genes *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*;

<sup>c</sup> 36 isolados provenientes do surto de Vila Franca de Xira, em 2014;

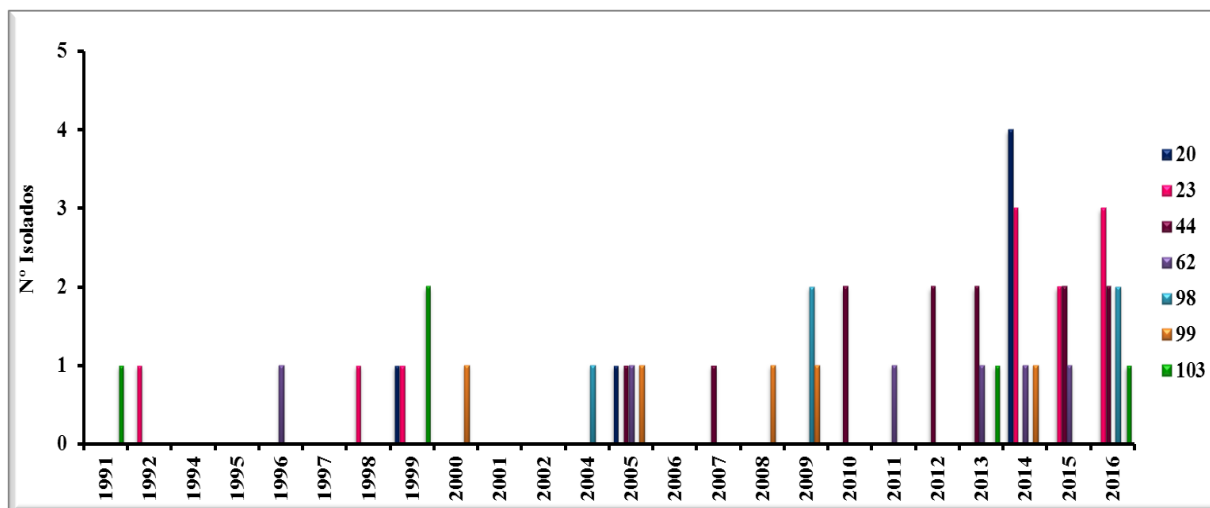
<sup>d</sup> dois isolados de um surto da comunidade no norte do país, em 2012 (AC2012);

<sup>e</sup> três isolados de um surto da comunidade no norte do país, em 2009;

n.a. não aplicável

### 2.2.1.3 Distribuição dos STs ao longo do período de estudo

Os oito STs mais representativos (ST20, ST23, ST44, ST62, ST98, ST99, ST103, ST1905) distribuíram-se irregularmente ao longo do período de estudo. O ST 44 (n=12) foi detetado em isolados recuperados a partir de 2005, o ST23 (n=11) foi associado a isolados dos anos 90 e dos três últimos anos, o ST62 (n=6) tem uma distribuição ao longo de todo o período de estudo e o ST99 (n=5) só está associado a isolados recolhidos a partir do ano 2000 (Figura 16). O ST1905 foi isolado durante os anos de 2014 e 2015. Este perfil não foi apresentado na figura porque o número de isolados é desproporcionado em relação ao dos restantes STs.

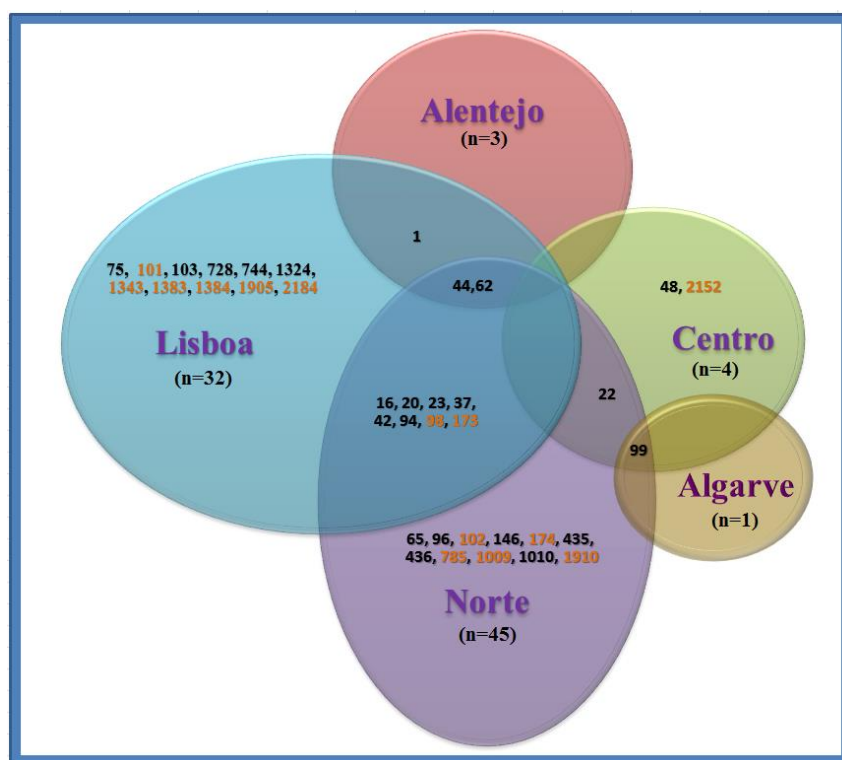


**Figura 16** – Distribuição dos STs pelo período de estudo.  
Só estão representados os STs associados a 5 ou mais isolados, com exceção do ST1905

#### 2.2.1.4 Distribuição geográfica dos subgrupos (MAbs) e STs (SBT)

Entre os seis subgrupos detetados, o Knoxville e o France/Allentown são os mais representados entre os isolados em estudo, o primeiro distribuiu-se pelas regiões de Lisboa, Norte, Centro e no Algarve, e o segundo por Lisboa, Norte e Alentejo.

Quanto aos STs, a maioria (87%) dos 37 STs foi identificada em isolados provenientes de duas regiões do país (Lisboa e Norte). Entre estes STs, dez são comuns a ambas as regiões (Figura 17).



**Figura 17** – Distribuição dos STs pelas cinco NUTS de Portugal continental

### 2.2.1.5 Poder discriminante dos MABs e SBT

Dos 143 isolados em estudo, 36 são oriundos do surto da comunidade de 2014, em Vila Franca de Xira, e cinco isolados foram recuperados de dois surtos da comunidade que ocorreram no norte do país, em 2009 e 2012. Assim, no total, o número de isolados não relacionados em estudo foi de 105, considerando como não relacionados, os isolados provenientes de casos considerados esporádicos e um representante de cada um dos três grupos de isolados associados a cada um dos três surtos da comunidade (foram incluídos como casos não relacionados os 24 isolados cuja origem é desconhecida).

Dos 105 isolados, 100 pertencem ao sg1, tendo sido diferenciados pelo MABs em seis subgrupos (IDS=0,723; CI<sub>95%</sub>: 0,682-0,763).

Pelo SBT, os 105 isolados não relacionados foram divididos em 37 STs (IDS=0,958; CI<sub>95%</sub>: 0,945-0,972). O *mompS* foi o *locus* mais discriminativo (IDS=0,860; CI<sub>95%</sub>:0,811-0,908) e o *proA* o menos (IDS=0,736; CI<sub>95%</sub>:0,675-0,796).

O número de alelos por *locus* variou entre 10 (*flaA* e *proA*) e 16 (*mompS*) (Anexo II), embora a maioria dos isolados esteja associada a determinados alelos, por exemplo, no *proA* a dois alelos (1 e 12), no *flaA* a quatro alelos (2, 4, 8, 12), Tabela 4.

**Tabela 4** - Distribuição dos isolados clínicos pelos alelos predominantes de cada um dos sete *locus* do SBT e respetivos SNPs

<i>Loci</i>	<i>flaA</i> (n=10) <sup>c</sup>	<i>pilE</i> (n=13)	<i>Asd</i> (n=14)	<i>Mip</i> (n=12)	<i>mompS</i> (n=16)	<i>proA</i> (n=10)	<i>neuA</i> (n=14)
<b>Alelos<sup>a</sup></b>	2 4 8 12	10 8 3	11 3 18 9	10 15 5	2 10 18	1 12	6 2 9
<b>Isolados (%)</b>	31 20 14 10	26 24 21	30 18 14 11	41 26 14	32 12 11	41 30	43 19 10
<b>SNPs<sup>b</sup></b>	4	19	5	6	8	10	8

<sup>a</sup> Alelos associado a mais de 10% dos isolados

<sup>b</sup> Número de SNPs entre os alelos mais representativos

<sup>c</sup> Número total de alelos para cada *locus*

O número de SNPs entre os alelos predominantes de cada *locus* varia de 4 (*flaA*) a 19 (*pilE*) (tabela 4). No anexo III apresentam-se os alinhamentos e assinalam-se os SNPs dos alelos predominantes de cada *locus* do SBT.

Na análise pelos dois métodos, os 100 isolados que foram distribuídos por 42 grupos STs (IDS=0,971; CI<sub>95%</sub>: 0.960-0.981).

### 2.2.1.6 Relação entre subgrupos (MABs) e STs (SBT)

Dos seis subgrupos identificados entre os isolados não relacionados, os subgrupos Philadelphia e o Knoxville e são os que apresentam maior diversidade de STs, respetivamente 15 e 13. No entanto, é de referir que estes são também os subgrupos com o maior número de isolados (Tabela5).



Os valores do CAW mostram que a probabilidade de dois isolados com o mesmo subgrupo apresentarem o mesmo ST é muito baixa (CAW = 0,064; CI<sub>95%</sub>: 0,033-0,095).

**Tabela 5** – Distribuição dos STs pelos subgrupos

Subgrupo	Nº de isolados	STs associados	Nº de STs
Knoxville	39	16, 20, 23, 42, 62, 94, 99, 101, 173, 435, 785, 2152, 2184	13
Philadelphia	27	1, 22, 23, 37, 44, 62, 98, 99, 102, 103, 146, 172, 436, 1010, 1910	15
France/Allentown	23	23, 44, 62, 75, 98, 101, 174, 1905	8
Benidorm	8	42, 62, 65, 96, 744, 1009	6
OLDA	2	1	1
Bellingham	1	48	1

#### 2.2.1.7 Relação entre ST (SBT) e subgrupo (MAbs)

A maioria (53%, 8/15) dos STs associados a mais de dois isolados não relacionados está associada a um único subgrupo. Dos restantes, cinco STs (33%) subdividem-se em dois subgrupos. O ST23 e o ST62 são os que apresentam maior diversidade, três e quatro subgrupos, respetivamente (Tabela 6).

Os valores do CAW mostram que a probabilidade de dois isolados com o mesmo ST pertencerem ao mesmo subgrupo é baixa (CAW = 0,560; CI<sub>95%</sub>: 0,395-0,726).

**Tabela 6** – Distribuição dos isolados e subgrupos pelos STs  
(retirado <http://www.comparingpartitions.info/index.php?link=Tut12>)

**Serogrupo  
(MAbs)**

ST (SBT)	Knoxville	Philadelphia	France/allentown	Benidorm	OLDA	Bellingham	Total
1910		1					1
1010		1					1
75			1				1
2184	1						1
2152	1						1
102		1					1
174			1				1
65				1			1
1009				1			1
48						1	1
96				1			1
744				1			1
435	2						2
22		2					2
173	2						2
146		2					2
785	2						2
101	2		1				3
16	3						3
1		1			2		3
1905			4				4
42	1			3			4
436		4					4
37		4					4
94	4						4
98		1	4				5
103		5					5
99	5						5
6							6
62	2	1	2	1			6
23	8	2	1				11
44	2		9				11
Total	39	27	23	8	2	1	100

### 2.2.1.8 Tipificação de isolados ambientais recuperados no decurso de surtos

No período em análise ocorreram dois surtos de pequenas dimensões no norte do país, um hospitalar, em 2011 (HospB) e outro na comunidade, em 2012 (AC2012).

No surto que ocorreu no HospB e que envolveu três doentes, foram recuperados um isolado clínico (E37, Anexo I) e três isolados ambientais. Os isolados ambientais, 637 e 641 foram recuperados, respetivamente, da água de um dos chuveiros e do lavatório da enfermaria, ambos do 4º piso da referida unidade de saúde. A origem do isolado 724 é desconhecida. A tipificação com os MAb e o SBT dos isolados 637 e 724 mostram que ambos estão associados ao mesmo ST e subgrupo, (Tabela 7). O isolado 641 não foi analisado porque não pertencia à espécie *L. pneumophila*.

O surto AC2012 decorreu entre outubro de 2011 e abril de 2012 e envolveu 20 doentes, registando-se dois óbitos, tendo o período mais crítico ocorrido entre janeiro e fevereiro, com a deteção de 15 doentes, dos quais foram recuperados apenas dois isolados clínicos (E38 e E39, Anexo I). No contexto do surto foram analisados dois isolados ambientais (L1200 e 1301503), recuperados de uma estação de lavagem de carros e de uma torre de refrigeração, respetivamente. Os resultados entre os isolados clínicos e ambientais não são coincidentes, (Tabela7).

**Tabela 7** – Tipificação dos isolados ambientais recolhidos no contexto das investigações ambientais de dois surtos de pequenas dimensões, (n=4)

Origem	Isolado	ST	Subgrupo
HospB	637	62	France/Allentown
	724		
AC2012	L1200	1293	OLDA
	1301503	42	Benidorm

### 2.2.2 Tipificação dos isolados de um hospital da área de Lisboa, 1987 – 2012

Num hospital da área de Lisboa (HospA) no período de 1987 a 2007 ocorreram 57 casos de DL adquiridos no hospital (DLAH), dos quais foram recuperados 35 isolados. Os casos aconteceram em pequenos surtos ou casos esporádicos com uma periodicidade de um a seis casos por ano. O último surto aconteceu em 2006, quando cinco casos foram detetados em quatro meses, três confirmados e dois prováveis, tendo-se registado um óbito. Como consequência deste último surto foram efetuadas alterações profundas no sistema de distribuição de água do hospital (SDAH) e implementados procedimentos de redução da exposição dos doentes a aerossóis. Desde então só foi diagnosticado um caso provável de DLAH em 2007.

Da história clínica dos 57 doentes, verificou-se que 40 tinham sido submetidos a transplante, seis tinham outras situações imunossupressoras e os restantes não pertenciam a grupos de risco para a Doença Legionário. Em cinco doentes a situação médica era desconhecida. No total, entre os 57 doentes com DLAH, 16 faleceram (Figura 18).

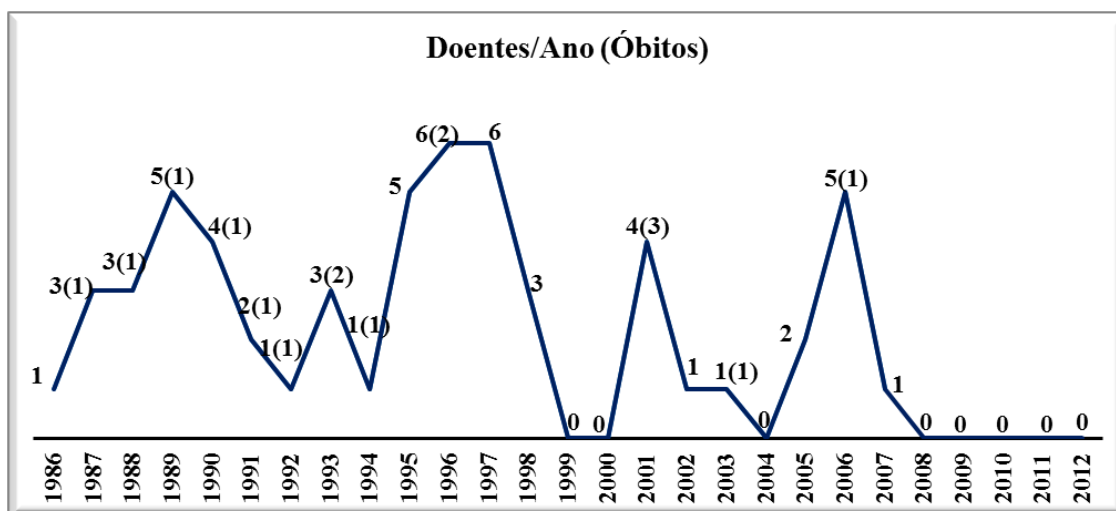


Figura 18 – Distribuição dos casos de DLAH de 1986 a 2012 no HospA (n=57)

Nas investigações ambientais realizadas entre 1989 e 1995 foram recolhidos 23 isolados de *Legionella* do SDAH, dos quais só foi possível analisar 14. Em 2006, aquando do último surto, foi realizada uma complexa investigação ambiental tendo sido recolhidas 27 amostras de água e zaragatoas de torneiras, chuveiros e tanques de aquecimento de água (fundo e linha de retorno), das quais 15 foram positivas para *Legionella*. Destas só 12 se encontravam viáveis para poderem ser analisadas neste trabalho. Desde então e até 2012 as análises ao SDAH foram negativas; nesse ano, as duas amostras de Janeiro tiveram um resultado positivo, mas só foi possível analisar uma.

Para o estudo destes isolados foram utilizados quatro métodos MAb, SBT, AFLP e WGS, (Anexo IV).

#### 2.2.2.1 Anticopos monoclonais (MAbs) e tipificação baseada em sequências (SBT)

No total foram analisados 62 isolados de *Legionella*, 58 dos quais *L. pneumophila* e quatro *L. taurinensis* (a identificação da espécie foi realizada por sequenciação do gene *mip*) (238).

Todos os isolados clínicos, à exceção de um, foram associados ao *sgl* (n=34), tendo sido subdivididos em dois subgrupos pelos MAb; 19 foram associados ao subgrupo France/Allentown e 15 ao Philadelphia. Aplicando o SBT, os isolados foram agrupados em quatro STs (ST100, ST62, ST172, ST1384), com 91% (32/35) dos isolados a serem associados ao ST100, (Tabela 8 e Figura 19).

**Tabela 8** – Variabilidade dos isolados clínicos e dos isolados ambientais recolhidos no HospA, respetivamente, de casos de DLAH (1987-2007) e do SDAH (1989 – 2012)

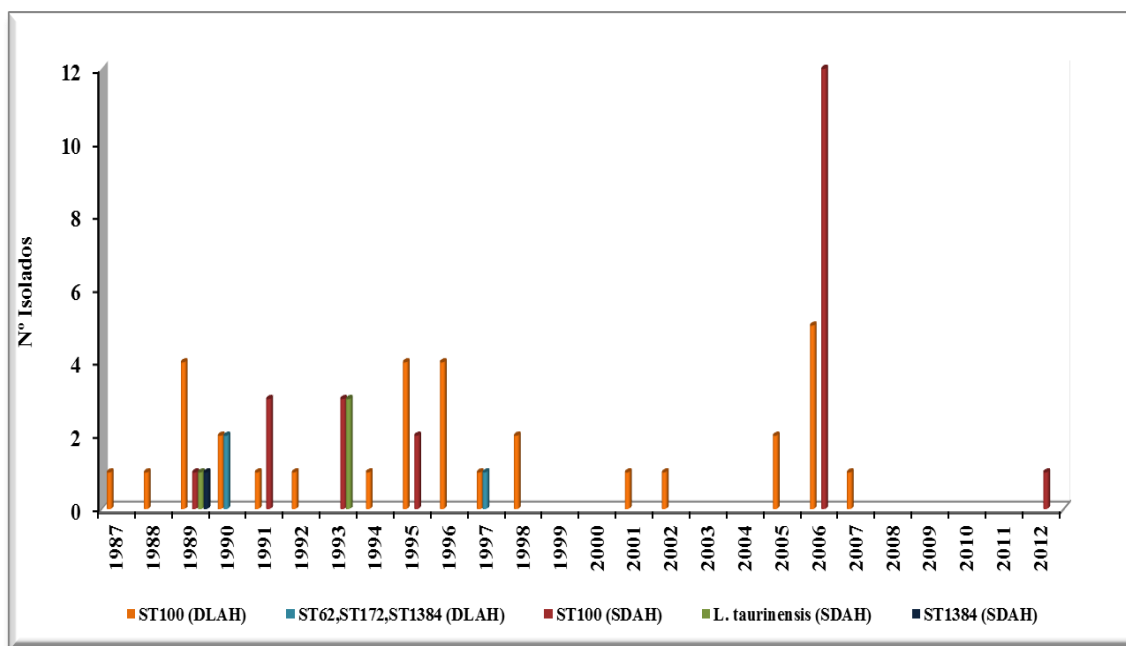
	SBT			MAbs		
	ST <sup>a</sup>	Perfil alélico <sup>a,b</sup>	Nº Isolados	Sg	Subgrupo	Nº Isolados
I. Clínicos	<b>100</b>	3,8,1,10,14,12,2	32	1	France/Allentown	18
					Philadelphia	14
	62	8,10,3,15,18,1,6	1	1	France/Allentown	1
	<b>172</b>	1,4,3,1,1,1,2	1	1	Philadelphia	1
	<b>1384</b>	<b>2,24,20,29,34,23,219</b>	1	14	n.a.	
I. Ambientais	<b>100</b>	3,8,1,10,14,12,2	22	1	France/Allentown	14
					Philadelphia	8
	<b>1384</b>	<b>2,24,20,29,34,23,219</b>	1	14	n.a.	

<sup>a</sup>A negrito STs e alelos novos

<sup>b</sup>Sequência dos genes *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*

n.a. - Não aplicável

Quanto aos isolados ambientais (n=27), quatro não são *L. pneumophila* e dos restantes só um não pertence ao sg1. Dos isolados *L. pneumophila* sg1, 14 pertencem ao subgrupo France/Allentown e oito ao subgrupo Philadelphia, (Tabela 8 e Figura 19).



**Figura 19** – Distribuição ao longo dos anos dos STs associados às amostras clínicas e ambientais do HospA

### 2.2.2.2 Polimorfismos de fragmentos amplificados por PCR (AFLP)

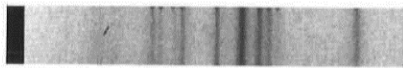
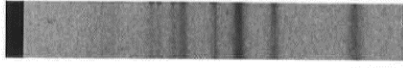
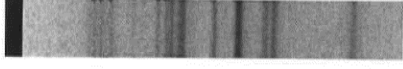

Na tipificação pelo AFLP foi possível associar todos os isolados testados a um AFLP-tipo, ou seja, a capacidade de tipificação do método foi de 100%. No que se refere à reprodutibilidade, em três das 11 repetições da estirpe padrão (EUL137) não foi obtido o resultado esperado (Tabela 9 e Figura 20).

**Tabela 9** – Resultados do ensaio de reprodutibilidade do AFLP com a estirpe EUL137

Amostra	AFLP-Tipo	Semelhança (%)
EUL 137	015 Dresden	95
	015 Dresden	100
	015 Dresden	95
	007 Copenhagen	96
	007 Copenhagen	96
	015 Dresden	91
	015 Dresden	91
	015 Dresden	95
	015 Dresden	96
	007 Copenhagen	96
	015 Dresden	90

#### Experiment: Standard EWGLI AFLP v1.2

Similarity coefficient: Dice (Opt:0.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [18.4%-79.0%]

Rank	Score	Key	Depositor	Sender designation	Country	mAb subgroup	EWGLI AFLP Type	Images
1	95.7	EUL 096	Dr S. Uldum	L810	Denmark	Bellingham	007 Copenhagen (TS)	
2	90.9	EUL 064	Prof S. Alexiou-Daniel	002/86	Greece	Knoxville	002B Lugano	
3	90.9	EUL 137	Dr C. Luck	Corby CA	England & Wales	Knoxville	015 Dresden (TS)	
4	90.9	EUL 066	Prof S. Alexiou-Daniel	013/86	Greece	Knoxville	002B Lugano	

**Figura 20** – Ensaio de reprodutibilidade do AFLP: quadro de resposta de uma das repetições da estirpe EUL137 em que não foi atribuído o AFLP-tipo correto. O perfil correto está assinado com o retângulo vermelho.

No estudo de cinco isolados não relacionados os duplicados foram concordantes, (tabela 10). A estabilidade dos resultados foi aferida utilizando ADN de cinco isolados não relacionados e com diferente número de subculturas no laboratório, extraído por dois kits diferentes, ilustra Nucleon BACC (GE Healthcare Life Sciences) e o Instagene Matrix kit (BioRad), (Tabela 10).

**Tabela 10** – Ensaio de estabilidade do AFLP: interferência do número de subculturas e do método de extração do ADN. No 2º teste os isolados tinham mais cinco subculturas.

Isolado	Kit extração	1º Teste		2º Teste	
		AFLP-Tipo	Semelhança (%)	AFLP-Tipo	Semelhança (%)
EUL137	A	015 Dresden	91		
	B		86		
Not1	A	010 London 017 Lugano 002B Lugano 024 Copenhagen	91	010 London 017 Lugano 002B Lugano 015 Dresden	90
	B	010 London	91	010 London 002B Lugano	95
Not2	A	010 London	91	010 London	90
	B		91	010 London 017 Lugano 002B Lugano	90
Not5	A	021 Lyon	91	021 Lyon	96
	B				91
Not6	A	001 Lugano	81	001 Lugano	91
	B		91	001 Lugano 028 Rome	91
Not7	A	013B London	96	013B London 030 Stockholm 013 London	88
	B	013 London	90,9	013 London	96

(A) Instagene Matrix, (B) Illustra Nucleon

A negrito os AFLP-tipo que foram associados a cada um dos isolados

A obtenção dos resultados, incluindo a análise dos géis no *BioNumerics*, ocorreu entre 72 a 96 h, depois de obtida a cultura pura.

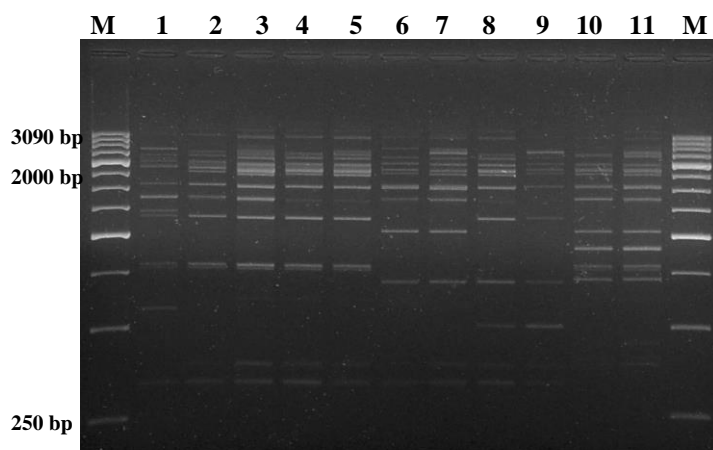
O método apresentou, no estudo de 24 isolados não relacionados, um IDS = 0,949 (CI<sub>95%</sub>: 0,904-0,995). Nesta mesma subamostra os MAb's apresentaram um IDS = 0,667 (CI<sub>95%</sub>: 0,553-0,780) e o SBT um IDS = 0,960 (CI<sub>95%</sub>: 0,934-0,986), Anexo VI. O AFLP dividiu os 24 isolados em 16 perfis diferentes, enquanto os MAb's e o SBT só discriminaram cinco e 15 perfis, respetivamente. Os três métodos em conjunto apresentaram um IDS = 0,996 (CI<sub>95%</sub>: 0,987-1,000), dividindo os 24 isolados em 23 perfis diferentes (Anexo VI).

### **Tipificação genotípica dos isolados do HospA, 1987-2012**

No total foram tipificados pelo AFLP 45 isolados, dos quais 33 são clínicos e 12 são ambientais. Os isolados clínicos foram subdivididos em sete AFLP-tipo diferentes, ao invés dos isolados ambientais que foram agrupados num único AFLP tipo, (Tabela 11). Na figura 21 apresenta-se um exemplo de um dos géis do AFLP.

**Tabela 11** – Variabilidade dos isolados clínicos e ambientais recuperados no HospA, segundo o método AFLP, (n=45)

	AFLP-tipo	Nº Isolados
<b>I. Clínicas</b>	013 London/013B London/030 Stockholm	17
	013 London	6
	013B London/030 Stockholm	6
	003 Glasgow	1
	028 Rome	1
	029 London	1
	019 Dresden	1
<b>I. Ambientais</b>	013 London	12



**Figura 21** – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de cinco AFLP-tipos diferentes

**M:** Marcador XVI, 250bp (Roche)  
**1:** 015 Dresden (Controlo-EUL 137)  
**2,3,4,5:** 013 London/013B London/030 Stockholm  
**6,7:** 013B London/030 Stockholm  
**8,9:** 013 London  
**10,11:** 028 Rome

### 2.2.2.3 Sequenciação total do genoma (WGS)

Esta metodologia foi aplicada em 49 isolados (Anexo IV), tendo sido rejeitado um isolado clínico (Pt-HSC6-89) na fase de análise dos resultados por revelar ter uma mistura de duas estirpes de *L. pneumophila*. Um dos isolados ambientais (Pt-A18-93) apresentou contaminação, mas este com um microrganismo diferente de *L. pneumophila*, possibilitando a sua inclusão no estudo porque foi possível a identificação do genoma correspondente ao isolado ST100.

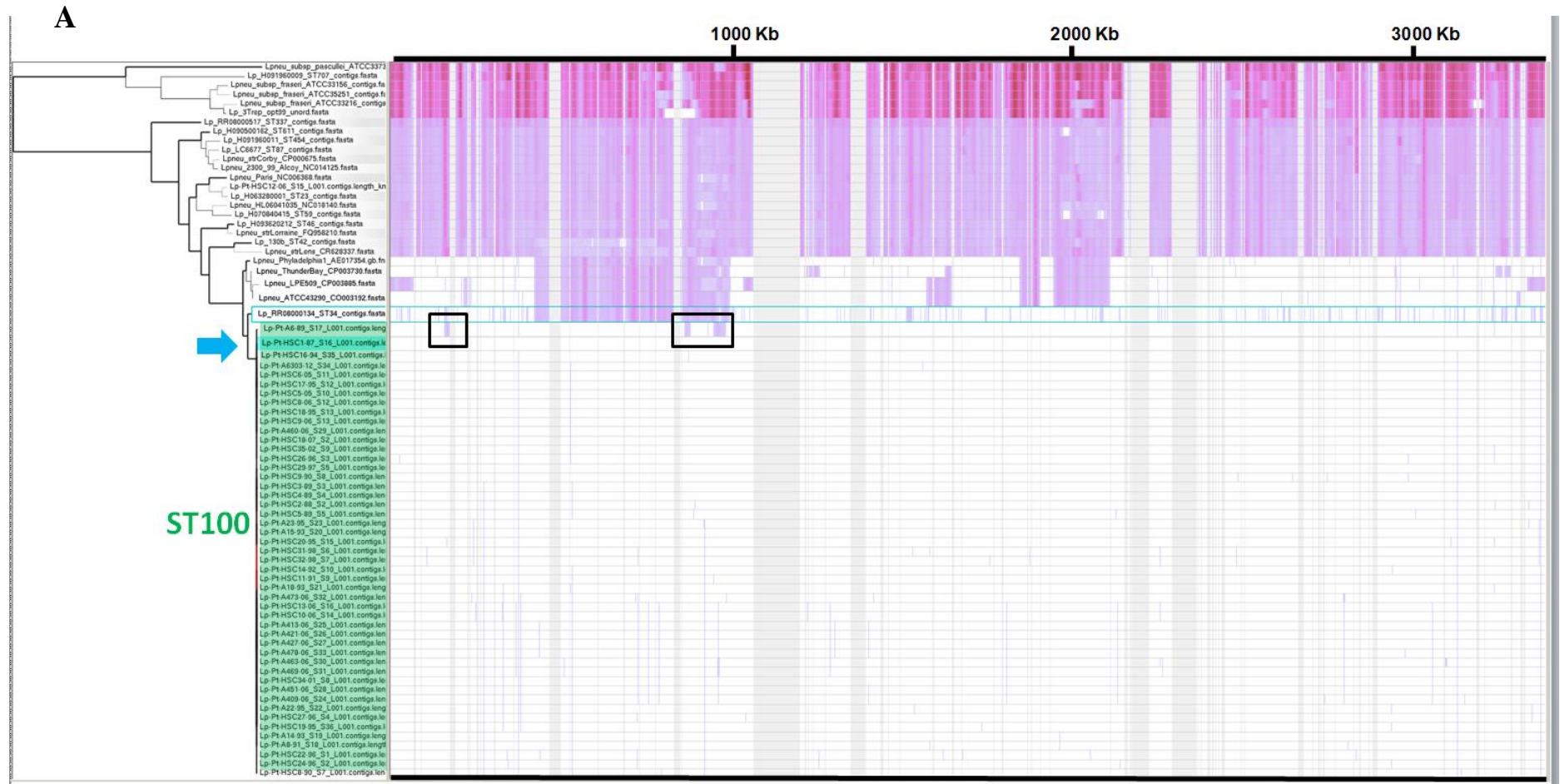
Os 48 isolados ST100 em estudo apresentaram um genoma com um tamanho estimado de ~3,26Mbp. Numa primeira análise, procedeu-se ao enquadramento dos genomas destes isolados no panorama da diversidade genética da espécie *L. pneumophila*. Para isso, compararam-se com o de estirpes representativas dessa diversidade (n=25, Anexo V) (17, 285), tendo esta análise envolvido um *core*-genoma de 58%. Verificou-se que os isolados ST100 apresentam uma relação clonal entre si (aqui designados de estirpe ST100). Esta estirpe apresenta uma maior proximidade filogenética com um isolado representativo do ST34 (Figura 22A). Curiosamente, embora as estirpes ST100 e Pt\_VFX/2014 (ST1905) apresentem uma grande diversidade

genética, partilham uma região genómica de ~95 Kb, a qual engloba os *loci* envolvidos na biossíntese do LPS. (Figura 22B).

Fez-se seguidamente uma análise genómica mais detalhada dos isolados da estirpe ST100. A representação filogenética destes isolados, baseada no número de diferenças nucleotídicas, distingue duas “linhagens” principais (I e II) e uma “sub-linhagem” (III). A linhagem I envolve os isolados recuperados durante um período de 25 anos e apresenta um baixo grau de diversidade genética (número máximo de SNPs entre isolados é 14). A linhagem II é mais heterogénea geneticamente (número máximo de SNPs é 45), sendo marcada pelo facto de todos os isolados recuperados nos anos “2000” pertencerem ao mesmo ramo filogenético (sub-linhagem III), (Figura 23A). Verifica-se, ainda, a existência de duas deleções genómicas, uma com ~9 kb e a outra com ~101 kb, sendo que a primeira é exclusiva e está presente em todos os isolados clínicos e ambientais das linhagens II e III. Num cenário quase paralelo, a deleção de ~101kb foi detectada em quase todos (28/32) os isolados das linhagens II e III, e em apenas um isolado da linhagem I (Pt-A6-89), (Figura 23B).

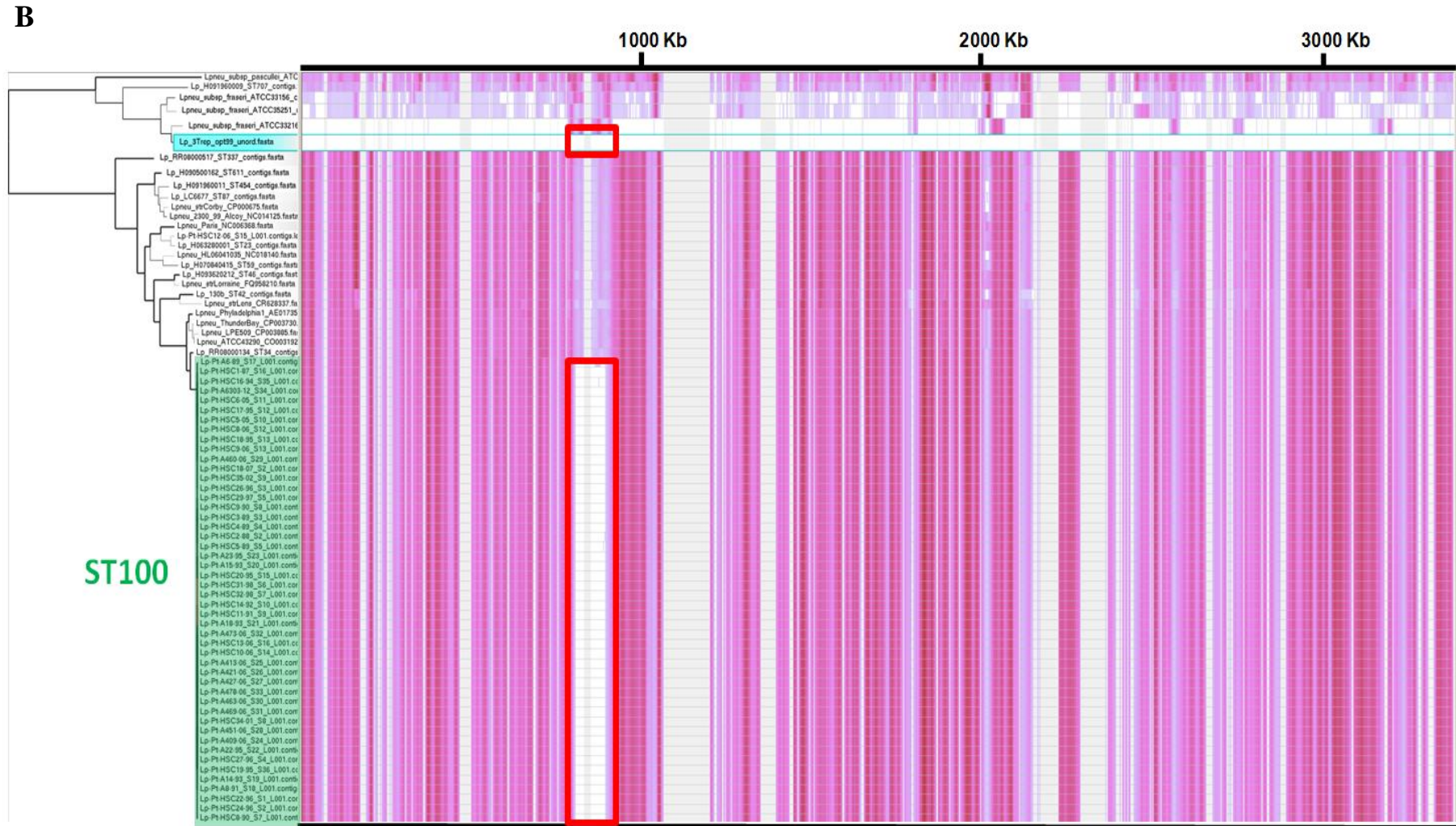
Considerando a microevolução da estirpe ST100 por ano de isolamento (Figura 24), verificamos um cenário de expansão clonal, dado que todos os isolados partilham um ancestral comum. Destacando-se na linhagem I dois grupos, um com dois isolados e outro com cinco, por não apresentam qualquer diferença nucleotídica, isto é, serem 100% similares em termos genómicos. O primeiro grupo é constituído pelos isolados recolhidos no doente de 2007 e do SDAH, em 2012, isto é, os últimos isolados, clínico e ambiental, recolhidos no HospA. O outro grupo é constituído por quatro isolados clínicos e um ambiental, recolhidos entre 2002 e 2006. Deve ainda ser realçada a linhagem III, constituída por 12 isolados, dos quais 11 são do surto de 2006, sendo a exceção um isolado clínico de 2001 cuja diferença nucleotídica é a maior do grupo.



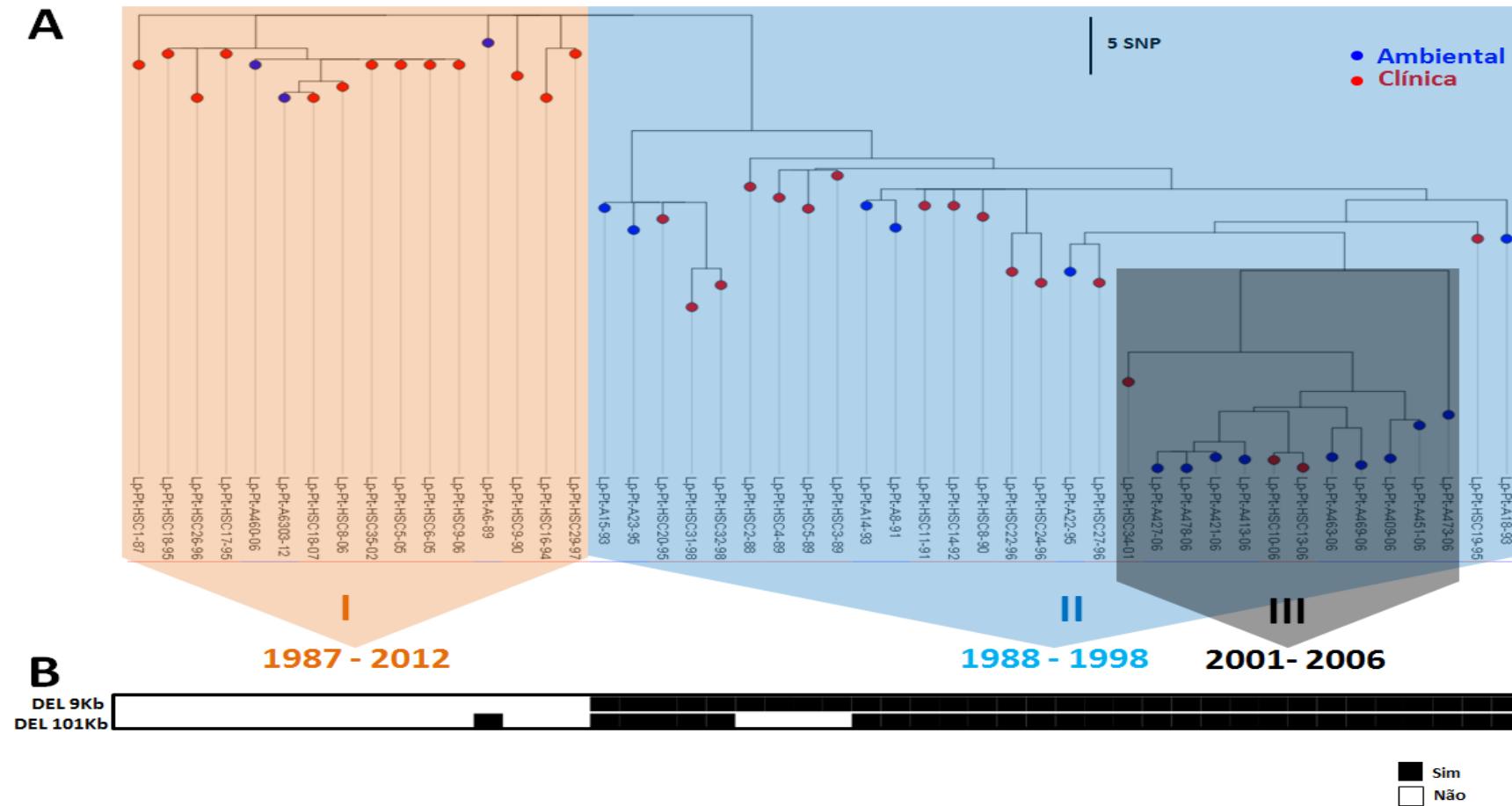


**Figura 22 A** - Enquadramento filogenético da estirpe ST100 na diversidade genómica da espécie *L. pneumophila*.

A reconstrução filogenética do core-genoma dos 48 isolados em estudo (30 clínicos e 18 ambientais), bem como de estirpes representativas dos maiores *clusters* filogenéticos dentro da espécie (Anexo V), mostra os isolados ST100 agrupados num único clone (sombreados a verde). Este clone apresenta uma maior proximidade filogenética com o *cluster* 14, aqui representado pelo genoma de uma estirpe com o ST34 (marcada com um contorno a azul). Na árvore associada está representada a diversidade genética ao longo do cromossoma através de um *degradé* de cores cuja intensidade da cor é proporcional ao número de mutações pontuais em relação ao primeiro isolado ST100 (Lp-Pt-HSC1-87), marcado com uma seta azul). Este painel mostra que a microevolução deste clone ST100 é marcada essencialmente pela fixação de mutações pontuais, com exceção de um dos isolados ambientais (Lp-Pt-A6-89) o qual parece ter trocado algumas regiões genómicas (marcadas com contorno a preto) por recombinação com outras estirpes filogeneticamente distantes. Este cenário evolutivo é apresentado com mais detalhe na Figura 23.



**Figura 22 B** - Comparação com a estirpe Pt\_VFX/2014 (ST1905) responsável pelo surto de Vila Franca de Xira, em 2014 (marcada com um contorno a azul). Destaca-se uma região genómica de ~95 Kb (marcada com um contorno vermelho), a qual engloba os *loci* envolvidos na biossíntese da LPS, cujo perfil mutacional dos isolados ST100, segundo análise preliminar, é partilhado unicamente com a estirpe ST1905. A descrição da análise bioinformática subjacente a esta figura, envolvendo o recurso aos *software SPAdes* e *Harvest*, detalhado no ponto 2.1.5 dos materiais e métodos do presente capítulo.

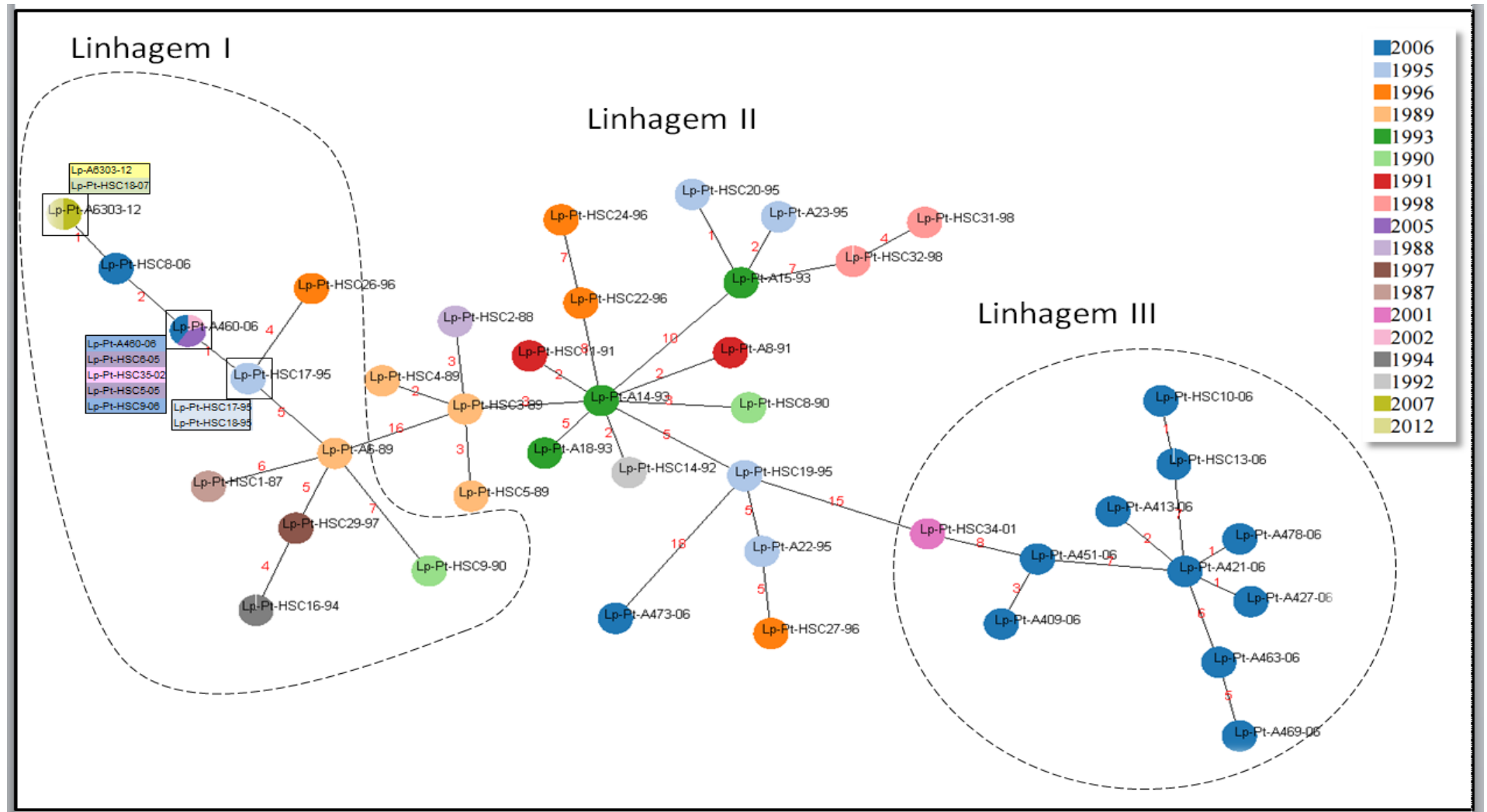


**Figura 23** - Filogenia e cronologia dos isolados ST100 associados ao HspA

**A** - Representação filogenética (baseada no número de diferenças nucleotídicas) dos 48 isolados ST100 em estudo. A origem de cada isolado (ambiental ou clínica) está representada por código de cores. Definem-se essencialmente duas “linhagens” (I e II, sombreadas a laranja e a azul, prospectivamente) e uma “sub-linhagem” (III, sombreada a cinzento) com alguma concordância no que respeita à cronologia da data de isolamento e ao grau de diversificação genética dos isolados.

**B** - O esquema representa a presença diferencial de duas deleções genómicas (~9 kb e ~101 kb) entre os isolados clínicos e ambientais em estudo. À exceção de um isolado da linhagem I, ambas as deleções são específicas de isolados das linhagens II e III. A descrição da análise bioinformática subjacente a esta figura, envolvendo o recurso às ferramentas bioinformáticas tais como *MAUVE*, *Snippy*, *MEGA5* e *Microreact*, está detalhada no ponto 2.1.5 do material e métodos deste capítulo





**Figura 24.** Microevolução dos isolados ST100 por data de recuperação.

Representação filogenética (análise *goeBURST* via *PHYLOViZ*) baseada no número de diferenças nucleotídicas entre os isolados ST100. Isolados com diferentes perfis mutacionais estão representados em diferentes círculos, sendo que a distância nucleotídica entre eles é referenciada em cada conexão, variando entre 1 e 18 diferenças. Um círculo pode ser representado por mais de um isolado, o que se verificou apenas na linhagem I (destacados por “boxes”). As cores estão associadas à data de recuperação.

### 2.2.3 Tipificação diretamente em amostras clínicas

A tipificação diretamente de amostras clínicas utilizando a técnica de *nested*-SBT foi aplicada a 11 amostras: três expetorações (Exp1, Exp2, Exp3) seis zaragatoas da nasofaringe (Zarag1, Zarag2, Zarag3, Zarag4, Zarag5, Zarag6) e dois sobrenadantes obtidos de culturas de amibas inoculadas com amostras respiratórias (G017, G036).

Na *nested*-PCR obteve-se um produto de amplificação com o tamanho esperado em 64% (49/77) das reações efetuadas, (tabela 12). O *locus* *pilE* foi amplificado em 10 amostras, o *neuA* em nove, o *asd* em sete, os *flaA* e *proA* em sete, o *mip* em cinco e o *mompS* só em três amostras.

Obteve-se um número alélico em 82% (40/49) das reações de sequenciação realizadas.

O ST só foi obtido nos sobrenadantes das culturas de amibas.

**Tabela 12** - N<sup>os</sup> alélicos e STs obtidos diretamente de amostras clínicas por *nested*-SBT

Amostra	Locus							ST
	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	
Exp 1		8					1	
Exp 2	12	8					6	
Exp 3	2	3	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	2	1	6	
Zarag 1	12	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>		13		
Zarag 2			<sup>a</sup>			12		
Zarag 3		8	<sup>a</sup>				<sup>a</sup>	
Zarag 4	12	8	11	<sup>a</sup>		12	4	
Zarag 5	12	8					2	
Zarag 6		8	15			1	2	
G017	2	3	18	13	25	5	6	75
G036	2	3	9	10	2	1	6	23

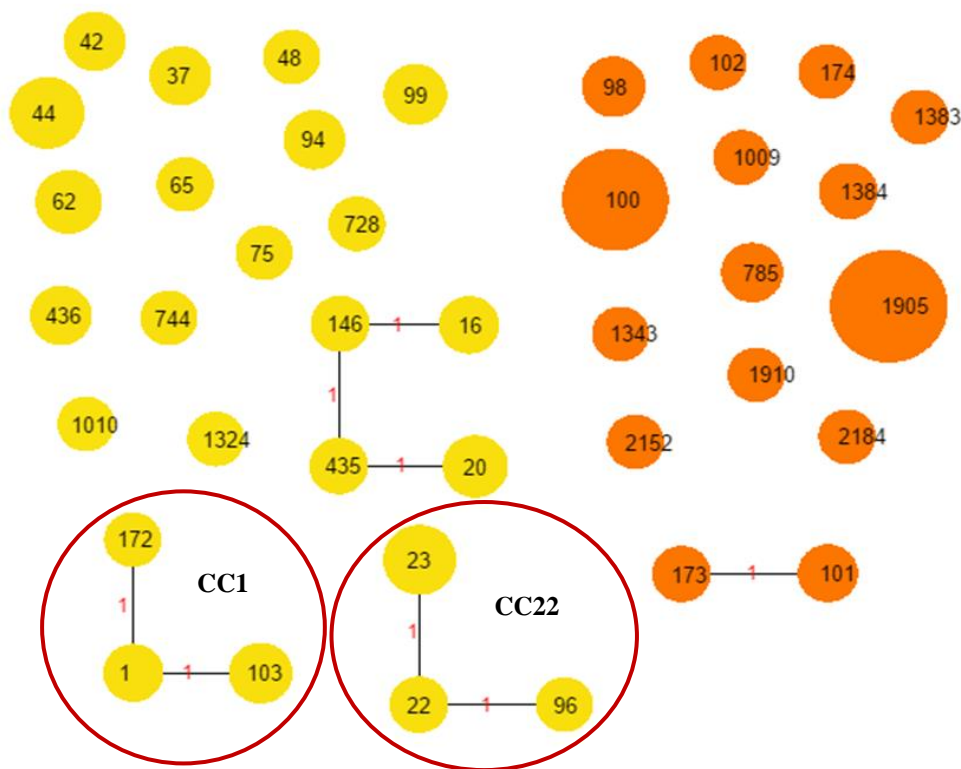
<sup>a</sup>Amplificou um fragmento com o tamanho esperado mas na sequenciação não se obteve sequência ou a sequência não apresentou a qualidade necessária para obter um n<sup>o</sup> alélico.

### 2.2.4 Relação filogenética entre os STs identificados em isolados clínicos em Portugal, 1987-2016

No total, foram identificados no presente trabalho 39 STs diferentes entre os 178 isolados clínicos recolhidos em Portugal entre 1987 e 2016. Dois STs (ST1905, ST100) incluem 40% (71/178) dos isolados em avaliação, 17 STs estão associados a um isolado, abrangendo no total 9% (17/178) da população. A maioria dos STs (51%, 20/39) agrupa entre 2 a 12 isolados. Entre os STs identificados 15 são específicos de Portugal.

A relação filogenética entre os isolados foi obtida a partir das sete sequências do SBT usando o *goeBURST* e de acordo com a definição mais restrita, que agrupa os STs que apresentam seis dos sete alelos idênticos (SLVs), 27 dos 39 STs identificados não apresentam qualquer relação com outro ST (*singletons*) e 12 STs são agrupados em quatro CCs. Estes CCs são constituídos

por dois a quatro STs e dado o número reduzido de STs só em dois deles é possível inferir um fundador (CC1, CC22), (Figura 25).



**Figura 25** – Relação filogenética dos STs identificados em isolados clínicos portugueses recuperados entre 1987 e 2016, (n=39)

A análise baseou-se nas diferenças de *locus* entre os STs, utilizando o *goeBURST*, através do *PHILOViZ*.

A cor laranja representa os STs específicos de Portugal e a amarela, os STs identificados em isolados portugueses mas que já tinham sido reportados por outros países à BD-EWGLI/SBT.

Os STs estão indicados pelos n<sup>os</sup> dentro dos círculos, o tamanho de cada círculo é proporcional ao n<sup>o</sup> de isolados associados ao ST. Os CCs são constituídos por SLVs conectados por linhas contínuas.

Os oito SLVs que originaram estes CCs ocorreram um no *locus* *pilE*, três no *neuA* e dois em cada um dos *loci* *asd* e *mip*.

Se na formação dos CCs aplicarmos a definição menos restrita, ou seja, se incluirmos os STs que apresentam somente cinco alelos iguais (DLVs), o número de ligações que se estabelecem passa de oito a 17, representados por 1 e 2 na matriz de distâncias gerada pelo *software* *PHYLOViZ* durante a análise *eBURST*, respetivamente (Figura 26). No entanto, com esta definição menos restrita 15 STs continuam *singletons*, entre eles, os dois STs que estão associados ao maior número de isolados clínicos (ST100 e ST1905). Nestas 17 ligações por DLVs o *loci* *proA* nunca variou, o *mompS* variou duas vezes, o *flaA* três, o *pilE* cinco, o *asd* sete, o *mip* oito e o *neuA* nove.

	1	16	20	22	23	37	42	44	48	62	65	75	94	96	98	99	100	101	102	103	146	172	173	174	435	436	728	744	785	1009	1010	1324	1343	1383	1384	1905	1910	2152	2184				
1	0																																										
16	6	0																																									
20	6	3	0																																								
22	6	3	2	0																																							
23	6	3	2	1	0																																						
37	5	7	7	7	7	0																																					
42	7	6	7	7	7	7	0																																				
44	7	6	7	6	6	7	4	0																																			
48	7	7	7	7	7	7	7	7	0																																		
62	5	5	4	5	5	7	7	7	7	0																																	
65	7	7	6	6	6	7	5	4	7	6	0																																
75	7	5	3	4	4	7	7	7	7	7	6	6	0																														
94	7	7	7	7	7	7	5	3	7	7	2	7	0																														
96	6	2	3	1	2	7	6	6	7	6	7	5	7	0																													
98	6	4	5	4	4	7	7	6	7	3	6	5	7	5	0																												
99	7	7	7	7	7	7	4	3	7	7	2	7	3	7	7	0																											
100	7	6	7	6	6	4	6	3	7	7	5	7	4	6	6	5	0																										
101	7	6	5	6	6	7	7	7	7	4	6	6	7	7	5	7	7	0																									
102	7	7	6	7	7	7	7	7	7	4	7	6	7	7	5	6	7	6	0																								
103	1	6	6	6	6	6	7	7	7	5	7	7	7	6	6	7	7	7	7	0																							
146	6	1	2	2	2	7	7	6	7	4	6	4	7	3	3	7	6	5	7	6	0																						
172	1	6	6	6	6	5	7	6	7	5	7	7	6	6	6	7	6	7	7	2	6	0																					
173	7	6	5	6	6	7	7	7	7	4	6	6	7	7	5	7	7	1	6	7	5	7	0																				
174	7	7	7	7	7	7	4	2	7	7	3	7	3	7	7	2	5	7	7	7	7	7	0																				
435	6	2	1	3	3	7	7	7	7	3	6	4	7	4	4	7	7	4	6	6	1	6	4	7	0																		
436	7	7	6	7	7	7	5	5	7	6	4	7	4	7	7	5	6	6	6	7	7	7	6	5	6	0																	
728	6	5	6	6	6	7	7	7	5	7	6	7	6	5	7	7	5	7	6	5	6	5	7	5	7	0																	
744	6	5	4	4	4	7	7	7	5	6	5	6	4	7	5	7	7	4	6	5	6	7	6	5	7	6	0																
785	7	6	6	7	7	7	6	7	6	6	7	7	7	6	7	7	3	6	7	7	7	4	7	6	6	7	7	0															
1009	7	6	7	7	7	3	6	7	7	7	7	7	6	7	7	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0																
1010	5	4	5	4	4	7	7	6	7	2	5	6	6	5	3	7	6	5	6	5	3	5	5	7	4	6	5	5	7	7	0												
1324	7	7	7	7	7	7	7	7	7	3	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	0												
1343	7	6	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	7	6	7	7	5	7	7	6	7	5	7	6	7	5	7	6	7	6	7	0											
1383	7	7	7	7	7	5	7	7	7	7	7	7	7	7	7	5	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0											
1384	7	6	6	6	6	7	7	7	7	7	6	7	6	7	7	7	7	7	6	7	7	6	7	6	6	7	7	7	7	7	7	0											
1905	7	6	7	6	6	7	7	5	7	7	7	6	6	7	5	7	7	6	6	7	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	7	0											
1910	5	6	5	6	6	7	7	6	7	2	6	7	6	5	6	6	4	5	6	5	6	6	5	6	6	5	6	7	4	7	7	7	7	7	7	7	7	0					
2152	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	6	7	7	5	7	7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0											
2184	7	6	6	5	5	7	7	6	7	6	6	7	6	5	7	6	6	7	5	7	6	7	6	7	6	7	7	7	5	7	7	7	7	7	7	7	4	7	2	0			

**Figura 26** - Matriz de distâncias entre os 39 STs gerada pelo *software* PHYLOViZ. A vermelho destacam-se os oito SLVs e a verde os 17 DLVs. A matriz apresenta recorrentemente os n<sup>os</sup> sete e seis, indicativos da diminuta relação filogenética que se verifica entre os 39 STs.

## 2.2.5 Integração dos STs identificados em Portugal na epidemiologia geral da *L. pneumophila*

A relação filogenética entre os 39 STs identificados em Portugal e os restantes da BD-EWGLI/SBT, inferida através do *goeBURST*, integra 33 STs em 16 CCs e mantém como *singletons* cinco dos STs específicos de Portugal (ST100, ST785, ST1383, ST1384, ST2152), (Anexo VII).

O CC146 é o que incluiu mais STs dos identificados no presente estudo, o ST16, ST20, ST75, ST146 e ST435. Os restantes CCs incluíram entre um a quatro STs, destacando-se cinco CCs que têm como fundadores um dos STs identificados em Portugal: CC1, CC23, CC37, CC42 e CC62.

O ST44, que foi associado a 12 dos isolados recuperados durante o período em estudo, está incluído no CC797 onde apresenta um SLV com o ST859 (Anexo VII). Este ST apresenta outros SLVs com outros STs nos *loci* *flaA* e *mip* (Tabela 13).

**Tabela 13** –STs BD-EWGLI/SBT que apresentam SLVs com o ST44 (informação retirada da matriz *eBURST* associada aos diagramas apresentados no Anexo VII)

ST	<i>Locus</i>						
	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA
<b>44<sup>a</sup></b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>2</b>
<b>539<sup>b</sup></b>	4	8	11	2	10	12	2
<b>859<sup>c</sup></b>	4	8	11	5	10	12	2
<b>1526<sup>d</sup></b>	12	8	11	10	10	12	2
<b>1936<sup>b</sup></b>	3	8	11	10	10	12	2

STs identificados: <sup>a</sup> Alemanha, Bélgica, EUA, França, Itália, R. Unido, Suíça; <sup>b</sup> França, Suíça; <sup>c</sup> França; <sup>d</sup> Espanha

O ST100, responsável por vários casos de infeção no HospA, apresenta um DLV com um ST identificado num único isolado recuperado em França em 2014 (Tabela 14).

**Tabela 14** – STs BD-EWGLI/SBT que apresentam SLVs com o ST100 (informação retirada da matriz *eBURST* associada aos diagramas apresentados no Anexo VII)

ST	<i>Locus</i>						
	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA
<b>100</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>2</b>
<b>1936<sup>a</sup></b>	3	8	11	10	10	12	2

<sup>a</sup> ST identificado em França

O ST1905, responsável pelo surto de Vila Franca, está incluído no CC154. Este ST para além do SLV que apresenta com o ST1237 (Anexo VII) tem ainda SLVs com outros seis STs. Os SLVs verificam unicamente em dois *loci*, o mip e o neuA (Tabela 15).

**Tabela 15** – STs BD-EWGLI/SBT que apresentam SLVs com o ST1905 (informação retirada da matriz *eBURST* associada aos diagramas apresentados no Anexo VII)

ST	<i>Locus</i>						
	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA
<b>1905</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>2</b>
<b>159<sup>a</sup></b>	11	14	16	1	15	13	2
<b>154<sup>b</sup></b>	11	14	16	16	15	13	2
<b>1127<sup>c</sup></b>	11	14	16	25	15	13	2
<b>2133<sup>d</sup></b>	11	14	16	76	15	13	2
<b>1237<sup>e</sup></b>	11	14	16	10	15	13	6
<b>2139<sup>e</sup></b>	11	14	16	10	15	13	9
<b>598<sup>d</sup></b>	11	14	16	10	15	13	11

STs identificados: <sup>a</sup> China, EUA, Holanda, Japão; <sup>b</sup> Canadá, China, EUA, França, Holanda, Itália, Japão, Kuwait, Noruega, R. Unido; <sup>c</sup> China; <sup>d</sup> Japão; <sup>e</sup> França



### **2.3. Discussão**

Muitos métodos têm sido utilizados na tipificação dos isolados clínicos e ambientais de *L. pneumophila*, tendo dois deles sido selecionados para implementação no Laboratório de Microbiologia da NMS|FCM (MAbs do painel de Dresden e o SBT), que à data da escolha nunca tinham sido utilizados em Portugal. Os métodos escolhidos eram os recomendados pelo EWGLI (atual ESGLI) para o estudo da *L. pneumophila*. A sua implementação ocorreu após a realização, pela candidata, de dois estágios em laboratórios de reconhecido mérito na área, o Centre National Référence de *Legionella*, Lyon (responsável: Sophie Jarraud) e o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Salud Carlos III de Madrid (responsável: Carmen Pelaz) e para garantir a sua adequada execução participamos à *posteriori* em painéis de aferição/avaliação externa da qualidade promovidos pelo EWGLI.

A aplicação destes métodos à tipificação dos isolados de *L. pneumophila*, recuperados de casos esporádicos e de surtos de DL, permitiu conhecer a epidemiologia da doença em Portugal, no período em estudo, e em particular, caracterizar a população de *L. pneumophila* responsável pelos casos de doença que necessitaram de hospitalização.

A utilização de MAbs na tipificação de isolados de *Legionella* em Portugal já tinha sido realizada por duas outras equipas (Marques e colaboradores e Veríssimo e colaboradores), (194, 298) que utilizaram os painéis de Joly e de Tobin. Atualmente, o ESGLI preconiza a utilização do painel de Dresden.

Para aferir as leituras do painel de Dresden, enviaram-se alguns dos isolados cuja classificação suscitou dúvidas, para Jurgen Helbig do Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Dresden, instituição responsável pela produção dos MAbs. O método apresentou um problema na leitura da fluorescência do MAb8/4, que inicialmente se atribuiu à falta de reprodutibilidade da marcação. Após várias repetições percebeu-se que o problema era a heterogeneidade da reação. No presente trabalho este comportamento heterogéneo do MAb8/4 influenciou o padrão de marcação e consequentemente a associação dos isolados a um dos subgrupos, France/Allentown ou Philadelphia. O problema foi resolvido estabelecendo um cut-off de positividade (positivo: presença de fluorescência forte em mais de 50% dos bacilos presentes no poço). Nos restantes MAbs a reação foi sempre homogénea em todos os bacilos presentes no poço e por isso nunca se verificou qualquer dificuldade na interpretação dos resultados. Ultrapassado este problema, as repetições foram reprodutíveis, confirmando-se ser este um excelente método de diferenciação fenotípica para os isolados *L. pneumophila* sg1. Sobre os recursos técnicos exigidos, a sua realização implicou a utilização de equipamentos usualmente disponíveis nos laboratórios, sendo o equipamento mais diferenciado o microscópio de fluorescência. Relativamente à rapidez e facilidade de execução, o método foi considerado rápido e fácil.

Quanto ao SBT, o laboratório participou em nove painéis de aferição/controlo externo da qualidade. O método revelou-se reprodutível, o mesmo isolado testado em ensaios independentes originou sempre o mesmo perfil. Sobre os recursos técnicos exigidos, a sua realização implicou a utilização de equipamentos usualmente disponíveis nos laboratórios de biologia molecular. Inicialmente houve alguma dificuldade com a utilização de programas informáticos que permitissem a visualização e análise dos eletrofluorogramas. Atualmente, a BD-EWGLI/BT inclui uma plataforma que permite a validação automática da qualidade das sequências e a deteção da zona alvo. No entanto, dados os custos envolvidos na sequenciação de duas cadeias (*forward* e a *reverse*) em sete genes, optou-se por sequenciar só uma delas e realizar todo o processo de seleção da zona de interesse fora da plataforma associada à BD-EWGLI/SBT (a plataforma automática exige a inserção das duas sequências). Por este processo, a atribuição do número alélico foi efetuada depois de, numa primeira fase, ser inspecionado visualmente o eletrofluorograma e a sequência, através do *Chromas*, e numa segunda, realizar o alinhamento com a sequência alvo no *Clustal Omega* ou de selecionar manualmente a sequência de estudo a inserir na BD-EWGLI/SBT. A sequenciação da segunda cadeia só foi necessária quando o eletrofluorograma apresentou baixa qualidade, com picos duplos, ausência de picos ou quando não apresentava o tamanho correspondente à zona de estudo. Quanto à rapidez e facilidade de execução, pode-se considerar o SBT um método rápido e fácil, considerando as múltiplas etapas que é necessário realizar. Os resultados obtidos por este método não são sujeitos a uma interpretação subjetiva do operador e por isso possuem uma boa reprodutibilidade inter-laboratório.

Outro método utilizado no presente trabalho foi o AFLP, cuja implementação foi igualmente acompanhada pela participação num painel de aferição do EWGLI. O método não é específico para o estudo da *L. pneumophila* e não mostrou a mesma facilidade de execução nem o mesmo padrão de reprodutibilidade dos anteriores, verificando-se discrepâncias no perfil de bandas em algumas das repetições, com ausência de bandas ou diminuição da sua intensidade, e consequentemente alterando o AFLP-tipo. Esta foi uma das razões para a sua aplicação unicamente ao estudo dos isolados do HospA.

No presente estudo identificou-se a diversidade fenotípica e genotípica dos isolados recuperados nos 12 anos do PVig Ep In da DL (n=134) e dos isolados de uma coleção recolhida entre 1987 e 2003 (n=71), com proveniências distintas, do HospA e de outros hospitais.

Esta identificação permite inferir a estrutura da população de *L. pneumophila* que em Portugal tem provocado DL. O estudo tem o viés inerente à baixa taxa de recuperação de isolados: de 2004 a 2016, das 1807 notificações recebidas no PVig Ep In da doença dos legionários só em 7% se obteve isolamento em cultura. A nossa situação é semelhante à existente em outros países

da Europa, por exemplo, em 2014 apenas 12% dos casos reportados aos ECDC foram diagnosticados por cultura, enquanto a pesquisa do antigénio urinário foi utilizada em 87% dos diagnósticos (81).

Todos os isolados analisados são *L. pneumophila* e 97% pertencem ao sg1, o que está de acordo com o que se verifica em outros países (4, 28, 91, 172, 215) e com os dados reportados ao ECDC, que em 2014 teve 95% dos casos notificados com *L. pneumophila*, dos quais 85% do sg1 (81). Na BD-EWGLI/SBT, nos seis países que nos últimos anos reportaram mais casos de DL ao ECDC (França, Itália, Espanha, Alemanha, Holanda e Reino Unido) a percentagem de isolados clínicos do sg1 variou entre 73% (Alemanha) e 96% (França e Itália). Como já referido, estes números podem não representar a verdadeira epidemiologia da DL, considerando que os métodos de diagnóstico não estão otimizados para a deteção de todos os serogrupos da *L. pneumophila* nem de outras espécies de *Legionella* (286).

Dos isolados *L. pneumophila* sg1 analisados 98% possuem o epítipo MAb3/1, a maioria (43%) apresentou o fenótipo France/Allentown, seguindo-se os fenótipos Knoxville e Philadelphia, respetivamente, com 30 e 20%. Estes números estão em concordância com o observado no estudo multicêntrico realizado na Europa em 2002, no qual a maioria dos isolados provenientes de infeções clínicas reagiu com o referido epítipo, 73% nas infeções adquiridas na comunidade e 47% nas infeções de origem hospitalar (135). Resultados similares foram encontrados por outras equipas (4, 91, 301), sugerindo que as estirpes que expressam este fenótipo são mais suscetíveis de causar doenças que as que não o possuem. Análises imunológicas sugerem que o epítipo que reage com o MAb3/1 é hidrofóbico, característica que favorece a permanência e sobrevivência da bactéria nos aerossóis e a aderência às células dos hospedeiros (133, 311), parecendo desempenhar um papel importante na virulência da bactéria (121).

No presente estudo o poder discriminante dos MABs foi mais baixo (IDS=0,723; n=105) que o verificado no estudo multicêntrico coordenado pelo EWGLI (IDS=0,838; n=1335), embora deva ser referido que a dimensão da amostra é substancialmente diferente. O padrão obtido apresenta a predominância dos subgrupos France/Allentown e Knoxville, segundo a BD-EWGLI/SBT, na França o subgrupo France/Allentown predomina, na Itália e na Espanha o Philadelphia, na Alemanha o Knoxville e no reino Unido os subgrupos France/Allentown e Benidorm. Na Holanda os isolados não são testados com os MABs. Citando alguns exemplos de países fora da Europa, no Japão predomina o subgrupo Benidorm, em Israel o Oxford/OLDA e no Canadá os subgrupos Knoxville e Philadelphia.

O SBT apresentou um padrão de diversidade (IDS=0,958; n=105) similar ao verificado em outros estudos (4, 91, 172, 242, 296). Entre os STs identificados, 49% estão associados a um isolado, 19% a dois ou três isolados, 27% entre quatro a seis isolados e só dois STs (ST23 e

ST44) estão associados a mais de 10 isolados. O ST23 é um dos STs mais prevalentes na BD-EWGLI/SBT, com 7% do total de notificações ambientais e clínicas enviadas por 63 países. Seguem-se os ST47 (5%), ST62 (4%) e ST37 (2%), mas o ST mais prevalente é o ST1 com 13% (BD-EWGLI/SBT acedida a 24/03/17). No conjunto, estes cinco STs são responsáveis por aproximadamente 50% dos casos de DL reportados pelos países do norte da Europa (50). Destes, só o ST47 não foi identificado em Portugal, dos STs identificados, 38% nunca tinham sido reportados à base de dados, correspondendo a 25% dos isolados não relacionados estudados no presente estudo.

No estudo dos isolados do HospA foram identificados outros dois novos STs, pelo que no total dos isolados recuperados entre 1987 e 2016 foram identificados 41% (16/39) de novos STs, todos eles foram inseridos na referida base de dados. No decurso do presente estudo foram ainda identificados outros três STs (ST99; ST103, ST153), que nunca tinham sido reportados, mas que presentemente já foram associados a pelo menos um isolado de outro país. Em estudos semelhantes o número de novos STs variou entre 6% (296) e 42% (215).

O presente estudo mostrou que a população de *L. pneumophila* que circula em Portugal e provoca infeção é heterogénea, composta por estirpes que até ao momento apenas foram encontradas no nosso país e por outras que se encontram disseminadas pelo mundo (35, 36). Dos STs identificados em Portugal, o mais prevalente entre os isolados epidemiologicamente não relacionados foi o ST23 (n=11); dado que o ST100 e o ST1905 estão associados a surtos, do HospA e da região de Vila Franca de Xira, respetivamente. O ST1 na amostragem analisada só foi associado a três isolados.

Relacionados com Portugal, na BD-EWGLI/SBT existem oito isolados clínicos que não foram identificados no contexto deste trabalho. Dois estão associados a viagens à região do Algarve, tendo sido identificados no Reino Unido, quatro tipificados por outra equipa de Lisboa (dois recuperados em doentes no norte do país e dois na região de Lisboa) e dois por uma equipa da região centro. A tipificação pelo SBT associou cinco dos isolados a novos ST (ST565, ST1962, ST1963, ST1967, ST2353). Constam ainda 10 isolados ambientais recuperados no contexto de análises rotina, cinco por uma equipa espanhola e os restantes por uma equipa do centro do país, três deles provenientes dos Açores. Em oito dos isolados foram identificados novos STs. O conjunto destes dados vem, naturalmente, aumentar o número de novos STs identificados no nosso país.

No estudo dos quatro isolados ambientais analisados no contexto de dois surtos, um no HospB e outro na comunidade, verificou-se que no primeiro caso existiu correspondência entre os resultados dos MAb e do SBT, comparando os dois isolados provenientes do sistema de distribuição de água do hospital com o isolado clínico que foi recuperado de um dos três

doentes envolvidos no surto hospitalar. Este resultado permitiu inferir que a origem da infeção foi muito provavelmente a água do hospital e assim proceder à implementação de medidas de prevenção e controlo adequadas para evitar o aparecimento de novos casos. No caso do surto da comunidade, AC2012, os dois isolados que foram recolhidos no contexto da investigação ambiental associada à deteção do surto, foram associados a subgrupos e STs diferentes dos identificados nos dois isolados clínicos epidemiologicamente relacionados. Este resultado não permitiu associar nenhum reservatório à disseminação da infeção.

A deteção dos reservatórios baseia-se no inquérito epidemiológico, que deve incluir um número alargado de fontes possíveis de infeção, o que nem sempre acontece, pelo que o modelo de questionário utilizado pode inviabilizar a localização do potencial foco infeccioso. Num surto de origem hospitalar o número destes potenciais focos é habitualmente menor que no contexto de um surto da comunidade, pelo que a sua identificação é habitualmente mais fácil.

Um estudo observacional realizado por uma equipa holandesa verificou que em 10 anos, só em 2% dos casos de DL diagnosticados foi identificada a fonte da infeção, concluindo que é necessário incluir nos inquéritos potenciais fontes até agora ignoradas (54). Na literatura já foram descritos surtos com origem em reservatórios improváveis, por exemplo, fontes decorativas aparentemente inofensivas (130, 224, 268), sistema purificador de ar (222), máquina de asfaltagem (41), humidificador frio (309), autocaravana (85) ou sistema de pulverização num estaleiro de construção (165). O estudo holandês realça ainda um aspeto já referido anteriormente por nós, a necessidade de melhorar os métodos laboratoriais de deteção de *Legionella* spp (54).

No estudo dos isolados do HospA, os 35 isolados clínicos analisados mostraram uma reduzida diversidade aplicando os MAbs (dois subgrupos) e o SBT (três STs), verificando-se que 91% dos isolados estão associados a um único ST (ST100). Aplicando o AFLP a 33 dos 35 isolados, estes foram divididos em sete AFLP tipos, considerando todas as hipóteses devolvidas pela base de dados, que nos casos com mais de uma hipótese (ex: 030 Stockholm/013BLondon/013London) reflete o grau de incerteza da atribuição a um AFLP-tipo específico. Verifica-se que os AFLP-tipos 030Stockholm/013BLondon/013London e 030Stockholm /013BLondon diferem entre si no posicionamento de duas bandas, uma a ~750bp e outra a ~1250bp. E que, no caso do 013London, a diferença em relação aos anteriores é a presença de uma banda adicional a ~500bp (figura 21). Podemos, assim, considerar que estes três AFLP-tipo estão muito próximos e se podem fundir num só. Importa referir que estas variações acontecem quando se analisam os isolados em séries diferentes. Os 12 isolados ambientais não apresentaram esta variação porque foram analisados na mesma série de restrição, amplificação e eletroforese. Pelo contrário, devido ao seu número mais elevado, não foi exequível a análise dos isolados clínicos na mesma série de eletroforese. Na nossa

experiência, esta variação inter-ensaio foi suficiente para as discrepâncias encontradas, o que constitui uma importante desvantagem desta metodologia. Assim, com esta ressalva poderemos afirmar que os isolados estudados distribuem-se, maioritariamente, pelo perfil 013London ou próximo deste perfil, tendo sido detetados outros quatro perfis, cada um com um único isolado, (003Glasgow, 028Rome, 029London, 019Dresden). Destes quatro isolados, o HSC7 (AFLP-tipo: 019Dresden) e o HSC30 (AFLP-tipo: 028Rome) apresentaram igualmente STs diferentes, ST62 e ST172, respetivamente. Outros dois (HSC19, HSC24) apresentaram o mesmo ST (ST100), (Anexo IV), sendo assim, os únicos que não foram concordantes nos resultados do SBT e do AFLP. O AFLP tipo 013London e o 003Glasgow constam da lista dos 16 mais reportados à base de dados, sendo que os outros três raramente foram identificados (tabela 2).

Como referido na introdução, o AFLP é um dos métodos utilizados em alguns laboratórios para tipificar isolados de *L. pneumophila* a nível local (91, 161, 179, 258). O EWGLI abandonou a recomendação da sua utilização e, consequentemente, a respetiva base de dados, porque apesar de terem sido padronizadas todas as fases do método, incluindo os reagentes e materiais a utilizar, os painéis de aferição/avaliação externa da qualidade indicaram falta de reprodutibilidade entre os laboratórios participantes. Verificou-se que a utilização de sistemas de captura da imagem da eletroforese com resoluções diferentes alterava os resultados da análise no *bioNumerics* e consequentemente o AFLP-tipo atribuído pela base de dados. Como a prioridade do grupo europeu é o desenvolvimento de métodos que permitam a comparação de dados entre laboratórios, o AFLP não se adequava a este objetivo.

No presente trabalho optou-se por não apresentar os resultados em forma de dendrograma, porque um dos objetivos era a comparação dos perfis circulantes na população portuguesa com os existentes em outros países, através do acesso a bases de dados específicas para o género *Legionella* e que reunissem dados obtidos com as metodologias recomendadas pelo EWGLI.

Os resultados da tipificação dos isolados clínicos e ambientais, com os três métodos, permitem afirmar que os casos esporádicos e os pequenos surtos de infeção no HospA foram provocados por estirpes presentes no SDAH (ST100 e ST1384). Quanto ao ST62, identificado num dos quatro doentes diagnosticados em 1990, não foi recuperado na água, embora não se possa descartar a hipótese deste perfil existir na água.

Vários estudos têm vindo a demonstrar a utilidade da WGS na vigilância epidemiológica e na tipificação de isolados provenientes de surtos da comunidade, devido ao seu elevado potencial discriminante quando comparado com o SBT (17, 171, 206, 216, 243, 257). No entanto, a sua aplicação ao estudo de surtos hospitalares ainda é restrita (11, 51, 124). Assim, pareceu-nos pertinente a sua aplicação ao estudo dos isolados recuperados no HospA, entre 1987 e 2012, com o objetivo de caracterizar o genoma da estirpe epidémica neste hospital da área de Lisboa, integrando-a na diversidade da espécie *L. pneumophila*, e por outro lado robustecer a relação

entre isolados clínicos e ambientais e a associação do SDAH aos múltiplos casos de DLAH diagnosticados no período de 1986 a 2007, (Figura 18).

O método encontra-se ainda em fase de discussão entre os membros do EWGLI, mas parece-nos inevitável que num futuro próximo o grupo recomende a sua utilização, dado o elevado nível de discriminação que permite. O SBT, considerado atualmente como *Gold standard* para a tipificação dos isolados de *L. pneumophila*, analisa ~2500bp, uma ínfima parte comparativamente ao que é possível estudar com a WGS. Este método permite a análise virtual de 100% dos ~3,4Mbp que constituem o genoma da *L. pneumophila*. Importa, no entanto, padronizar procedimentos, definir qual o nº de SNPs que distingue os isolados relacionados dos não relacionados, e criar uma base de dados, para que este método possa ser recomendado pelo EWGLI.

A WGS agrupou os 48 isolados ST100 num único clone, com uma microevolução marcada essencialmente pela fixação de mutações pontuais, com exceção para o LP-Pt-A6-89, o qual parece ter trocado algumas regiões genómicas por recombinação com outras estirpes (Figura 22A).

Na análise filogenética incluíram-se estirpes de diferentes subespécies da *L. pneumophila* (*pneumophila*, *fraseri* e *pascullei*), ao contrário da maioria dos estudos realizados até ao momento, com objetivo de aumentar a amplitude da comparação. As 25 estirpes foram selecionadas de Underwood e colaboradores e de Borges e colaboradores (17, 285). Esta análise mostrou que todos os isolados recolhidos no HospA são divergentes das estirpes utilizadas para o enquadramento filogenético, especificamente as associadas a grandes surtos (Philadelphia-1, Paris, Lens, Corby e 2300/99 Alcoy), sendo que dentro deste grupo a Philadelphia-1 é filogeneticamente mais próxima (Anexo V, Zoom da Figura 22A).

O alinhamento posiciona o clone ST100 próximo do *cluster* 14, representado por uma estirpe ST34 (285). Curiosamente, o ST34 tem pouca expressão na BD-EWGLI/SBT, está associado a 11 dos 11568 isolados reportados, tendo sido identificado em isolados clínicos e ambientais de cinco países, o mais longínquo dos quais foi recolhido em 2001 (BD-EWGLI/SBT acedida a 24/03/17).

A estirpe ST100 apresentou a particularidade de partilhar uma região associada à biossíntese do LPS com outra estirpe específica de Portugal, Pt\_VFX/2014 (ST1905), da qual é filogeneticamente distante (Figura 22B). Segundo a análise preliminar do perfil mutacional da estirpe ST100, esta região parece só ser partilhada entre estas duas estirpes. Na estirpe Pt\_VFX/2014 (ST1905) a região parece ter sido importada por transferência horizontal (17). O LPS é não só a base para a classificação em serogrupos como também o maior antigénio da *L. pneumophila* (32, 135); as vesículas libertadas pela bactéria durante o processo de replicação intracelular contêm LPS e são responsáveis por inibir a fusão do lisossoma com o fagossoma, impedindo desta forma a destruição da bactéria.

Dos resultados obtidos destaca-se o potencial de resolução do método que permitiu diferenciar três sub-linhagens dentro do clone formado pelos isolados recolhidos ao longo de 26 anos. A distribuição dos isolados por estas linhagens apresenta alguma relação cronológica e, com a exceção de cinco, agrupa os isolados que sofreram as deleções em duas destas linhagens. A diversidade evidenciada foi baixa, apresentando um número máximo de 45 SNPs entre isolados ( $\bar{x} = 23,45$  SNPs). Contudo, é curioso observar que a linhagem 1 apresenta um menor grau de diversidade genética, apesar de ser representada por isolados recuperados durante os 26 anos em estudo. Por exemplo, esta linhagem compreende não só cinco isolados (ambientais e clínicos) recolhidos num intervalo de 4 anos que se revelaram indistinguíveis (por exemplo, os isolados clínicos Lp-Pt-HSC35 de 2002 e Lp-Pt-HSC9 de 2006), como também isolados recuperados com 17 anos de diferença com apenas 4 SNPs (Lp-Pt-HSC17-95 *versus* Lp-Pt-A6303-12). E ainda, o isolado ambiental de 2012 (Lp-Pt-A6303-12), 100% similar em termos genómicos ao isolado recuperado do último caso de DL que ocorreu em 2007 (Lp-Pt-HSC18-06). Esta evidência demonstra que a linhagem que desde 1987 originou vários casos de DL no HospA e que se considerava erradicada em 2007 pela implementação de procedimentos de manutenção mais restritos voltou a recolonizar o SDAH. No que diz respeito às outras linhagens, o aparecimento da sub-linhagem III, a qual é representada por todos os 12 isolados da linhagem II colhidos a partir do ano 2001, sugere que os SNPs associados à sua emergência lhe terão conferido um incremento de *fitness* (Chasqueira e col., em preparação para publicação). David e colaboradores (50) verificaram que as principais estirpes associadas à DL (ST1, ST23, ST37, ST47 e ST62) evidenciavam baixas taxas de evolução sugerindo que a bactéria sofre períodos de dormência, dentro das amibas, dos biofilmes ou durante a fase livre, sempre que a temperatura da água seja <15°C. Estes dados parecem suportar os resultados do presente estudo. De facto, a baixa taxa de mutação verificada para a estirpe ST100 durante o período de 26 anos no HospA sugere a ocorrência de períodos de latência com casos de infecção intermitentes, demonstrando a importância da vigilância contínua. Os mesmos autores verificaram ainda que isolados do mesmo clone, provenientes de países ou continentes diferentes, apresentavam baixo número de SNPs, o que indicia um surgimento recente e uma disseminação rápida dos clones a longa distância. Entre as várias vias plausíveis para esta rápida dispersão, apontaram a hipótese de o homem funcionar como vetor, transmitindo a doença entre si ou ao ambiente (50). Para esta suposição contribuiu a recente evidência de transmissão inter-humana, descrita por uma equipa portuguesa na sequência do surto de Vila Franca de Xira (40).

A tipificação direta a partir de amostras clínicas (*nested*-SBT) tem vindo a ser utilizada em estudos epidemiológicos de surtos, como no caso do surto de Vila Franca de Xira (dados não publicados) e em outras situações (75, 204, 257). Este método tem a grande vantagem de reduzir o tempo para a obtenção de resultados preliminares de tipificação e de ultrapassar a necessidade



dos isolados, muito importante dado que nem sempre se obtém crescimento no meio de cultura. Segundo Mentasti e colaboradores, só em 65% dos doentes com DL, diagnosticada pela presença de antígenos na urina, e com tosse produtiva se obtém isolados de *Legionella* (202). O mesmo autor, num estudo posterior, demonstrou que é possível uma significativa redução no tempo de resposta quando foi utilizada a *nested*-SBT na tipificação. Este método em média permitiu uma resposta ao fim de 2 dias (mínimo um e máximo cinco dias), em comparação com os 10 dias (mínimo cinco e máximo 20) necessários, em média no protocolo SBT (204).

No presente estudo, após a participação num painel de aferição do EWGLI, a *nested*-SBT foi aplicada a 11 produtos biológicos de três origens diferentes (três expetorações, seis zaragatoas da nasofaringe e dois sobrenadantes de culturas de amibas inoculadas com amostras respiratórias). Todas as amostras, com exceção de uma, tiveram culturas em BCYE negativas e nesta o SBT confirmou o resultado da *nested*-SBT.

Os resultados obtidos foram diferentes consoante os produtos, o ST só foi identificado nas amostras dos sobrenadantes das culturas de amibas, isto é, em 18% (2/11) das amostras testadas, obtendo-se nas restantes entre um a cinco alelos, em 18% conseguiram-se cinco alelos, em 27% três a quatro e em 36% um a dois alelos. Estas percentagens são diferentes das apresentadas por outros estudos, como por exemplo Mentasti e colaboradores, que obtiveram um ST em 50% das 18 amostras provenientes de sete surtos, sendo que nas restantes conseguiram cinco a seis em sete alelos (204). Sánchez-Busó e colaboradores obtiveram um ST em 40% das 10 amostras recolhidas durante um surto num hotel e nas restantes cinco a seis alelos, à exceção de uma, em que apenas foi obtido um alelo (257). A diferença entre o nosso estudo e os anteriormente referenciados é que nestes só foram analisadas amostras provenientes do aparelho respiratório baixo, expetorações e lavados bronco-alveolares, e nós utilizámos maioritariamente (55%, 6/11) zaragatoas da nasofaringe. Este tipo de amostra, embora já tenha sido usado anteriormente, não é o melhor para o diagnóstico de DL. Estes resultados podem ainda ser explicados pela baixa quantidade de ADN presente nos extratos, devido ao baixo inóculo de *Legionella* presente nestes produtos biológicos; por um lado, as culturas foram todas negativas, à exceção de uma, e por outro, os resultados do PCR variaram entre  $32 > Ct < 39$ , valores considerados elevados dado que o protocolo de PCR utilizado que tem 40 ciclos (dados não apresentados). Nos estudos aqui referenciados, o primeiro só testou a *nested*-SBT em amostras com culturas positivas e no segundo, não é evidente qual a percentagem de positividade das culturas.

O facto de só a partir dos sobrenadantes da cultura de amibas se ter conseguido a classificar o ST está de acordo com o que se sabe sobre o papel deste protozoário na amplificação do inóculo (55, 148, 168, 250).

Das amostras por nós utilizadas só as zaragatoas são suspeitas de pertencerem a dois surtos, surto 1 (Zarag1, 2 e 4) e surto 2 (Zarag3, 5 e 6).

No caso do surto 1, apesar de só alguns alelos terem sido identificados, os resultados permitem inferir que a *L. pneumophila* do doente 1 (Zarag1) é diferente das outras duas. O alelo do *locus* *proA*, detetado nas três amostras; não é coincidente na zarag1 (Tabela 12). De notar que os dois doentes cuja *L. pneumophila* tem alelos idênticos (Zarag2 e 4) adoeceram no mesmo dia e o doente da Zarag1 adoeceu passado 15 dias, o que está de acordo com os resultados obtidos com a tipificação. No hipotético surto 2 os resultados obtidos não permitem qualquer inferência, porque as três amostras só têm o *locus* *pilE* amplificado em comum (Chasqueira e col, enviado para publicação).

No estudo da relação filogenética entre os STs identificados em isolados clínicos em Portugal, entre 1987 e 2016, utilizou-se o *goeBURST* através do *PHYLOViZ*, plataforma desenvolvida por uma equipa portuguesa (92). Esta ferramenta permite, usando a definição mais restrita, visualizar as ligações entre STs que divergiram muito recentemente e que diferem apenas num SLV. Os diagramas gerados pelo *eBURST* possuem sobre os dendrogramas as vantagens de facilitar a interpretação da informação, fornecer hipóteses sobre a origem (fundador) e permitir obter o padrão de descendentes. Os CCs são constituídos por estirpes que divergiram do fundador num dos alelos através de mutações pontuais ou recombinação (87, 92, 93).

Os 39 STs identificados mostram uma baixa relação entre si, a maioria (69%, 27/39) são *singletons* e os quatro CCs formados têm um número reduzido de STs, no máximo quatro. A integração destes 39 STs na epidemiologia geral da *L. pneumophila* foi acedida através da BD-EWGLI/SBT, usando o mesmo algoritmo e a definição restrita (ligação por SLVs), verificando-se que a maioria (85%, 33/39) estabeleceu relação com pelo menos um dos STs presentes na base de dados. Para além dos SLVs apresentados nos diagramas do anexo VII, é importante ter atenção à matriz que é gerada pelo *PHYLOViZ* para identificar possíveis SLVs não representados no diagrama, foi o que aconteceu no ST44 e ST1905. Verificou-se, ainda que cinco dos STs permaneceram *singletons*, entre eles o ST100. Dado que a população de *L. pneumophila* responsável por casos de DL em Portugal é uma mistura entre STs específicos e comuns a outros países não surpreende que em 56% (9/16) dos CCs formados, o fundador seja um dos STs identificados em Portugal. Esta relação entre os genótipos identificados em Portugal e em outros países está de acordo com a ideia de que a bactéria tem uma elevada capacidade de adaptação a nichos ecológicos específicos. Esta versatilidade é-lhe conferida por um genoma altamente dinâmico que evolui, entre outros, por transferência horizontal de genes, provavelmente transferidos dos seus hospedeiros ou de outros elementos dos biofilmes que coloniza (17, 31, 118).

O presente estudo permitiu conhecer a epidemiologia da DL em Portugal, tanto quanto nos foi possível saber, em particular a diversidade da *L. pneumophila*, que durante o período em análise

circulou e provocou casos graves de doença no nosso país, contribuindo desta forma para aumentar o conhecimento global sobre a bactéria. Realçou a importância da tipificação como ferramenta essencial em situações como as vivenciadas no HospA, com diagnósticos consecutivos de DL, confirmando que se tratavam de pequenos surtos de origem hospitalar e não de um aglomerado fortuito de casos não relacionados. Neste caso, a utilização de uma metodologia com elevado poder discriminante permitiu confirmar o SDAH como responsável pelos casos de DL e aceder à microevolução da estirpe epidémica.

Por último, o presente trabalho, através da investigação sobre as relações filogenéticas entre as estirpes identificadas e as reportadas à BD-EWGLI/SBT, evidenciou possíveis linhas evolutivas.



## Capítulo 3 - Interação *Legionella pneumophila* e *Acanthamoeba castellanii*

### 3.1 Material e métodos

O presente capítulo é dedicado ao estudo da capacidade invasiva e de multiplicação intracelular de três estirpes de *L. pneumophila* em *A. castellanii* e à avaliação do transcrito da bactéria após contato com este hospedeiro.

Para tal, começámos por inocular culturas de *A. castellanii* com os isolados em estudo. Este processo, aqui designado de co-culturas Lp-Ac, teve dois procedimentos diferentes: um, que utilizou bactérias provenientes diretamente de uma cultura em meio sólido ou líquido, ao qual será atribuída a designação de 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac; outro, que utilizou bactérias recolhidas após um 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac e que será referenciado como 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac. Em ambos os casos e em tempos pré-determinados foram recolhidas as bactérias intracelulares e/ou extracelulares para posteriores quantificações.

Todas as etapas inerentes a estas co-culturas foram realizadas no laboratório de cultura de células, da NOVA Médica School (antiga FCM) em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair), utilizando material estéril e sempre que possível descartável.

O estudo do transcrito de *L. pneumophila* após co-cultura Lp-Ac foi realizado por *microarrays* na *Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires - Institut Pasteur*, Paris, (UBBI) durante um dos estágios realizados nesta unidade. A expressão génica de genes alvo, selecionados dos *microarrays*, foi confirmada por PCR em tempo real (PCR-TR). Todos os procedimentos envolvidos na metodologia da PCR foram realizados em salas específicas: sala de extracção do ARN e sala de preparação da mistura de reagentes da PCR, utilizando material estéril, livre de DNases e RNases.

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas nestes estudos foram preparados no laboratório de acordo com o anexo VIII.

#### 3.1.1 Cultura *Legionella pneumophila* e *Acanthamoeba castellanii*

As estirpes de *L. pneumophila*, à semelhança do capítulo anterior, foram preservadas a -80°C, em meio de conservação de bactérias (Anexo VIII). Após descongelação, a sua utilização só se efetuou depois de duas subculturas em BCYE- $\alpha$  a 37°C (tempo de estabilização). Os isolados em estudo foram: LpP (estirpe ST1), cedida pela unidade de investigação - UBBI; E18 (estirpe ST100); E96 (estirpe ST1905); isolados pertencentes à coleção caracterizada no capítulo anterior.

A espécie *A. castellanii* (estirpe Neff ATCC 30010) foi preservada a -80°C em meio de conservação de células (Anexo VIII) e após descongelação foi mantida à temperatura ambiente em frascos de 25cm<sup>2</sup>, num meio com peptona, extrato de levedura e glucose (PYG). A cultura foi mantida viável através de subculturas sempre que a monocamada ficou confluenta, o que aconteceu em média, a cada 3 dias.

### **3.1.2 Ciclo de co-cultura *Legionella pneumophila*-*Acanthamoeba castellanii***

Para a sua realização inoculámos culturas de *A. castellanii* com 48h de subcultura com os isolados de *L. pneumophila* em estudo, ambos em meio mínimo para co-cultura (MMCC), (figura 27).

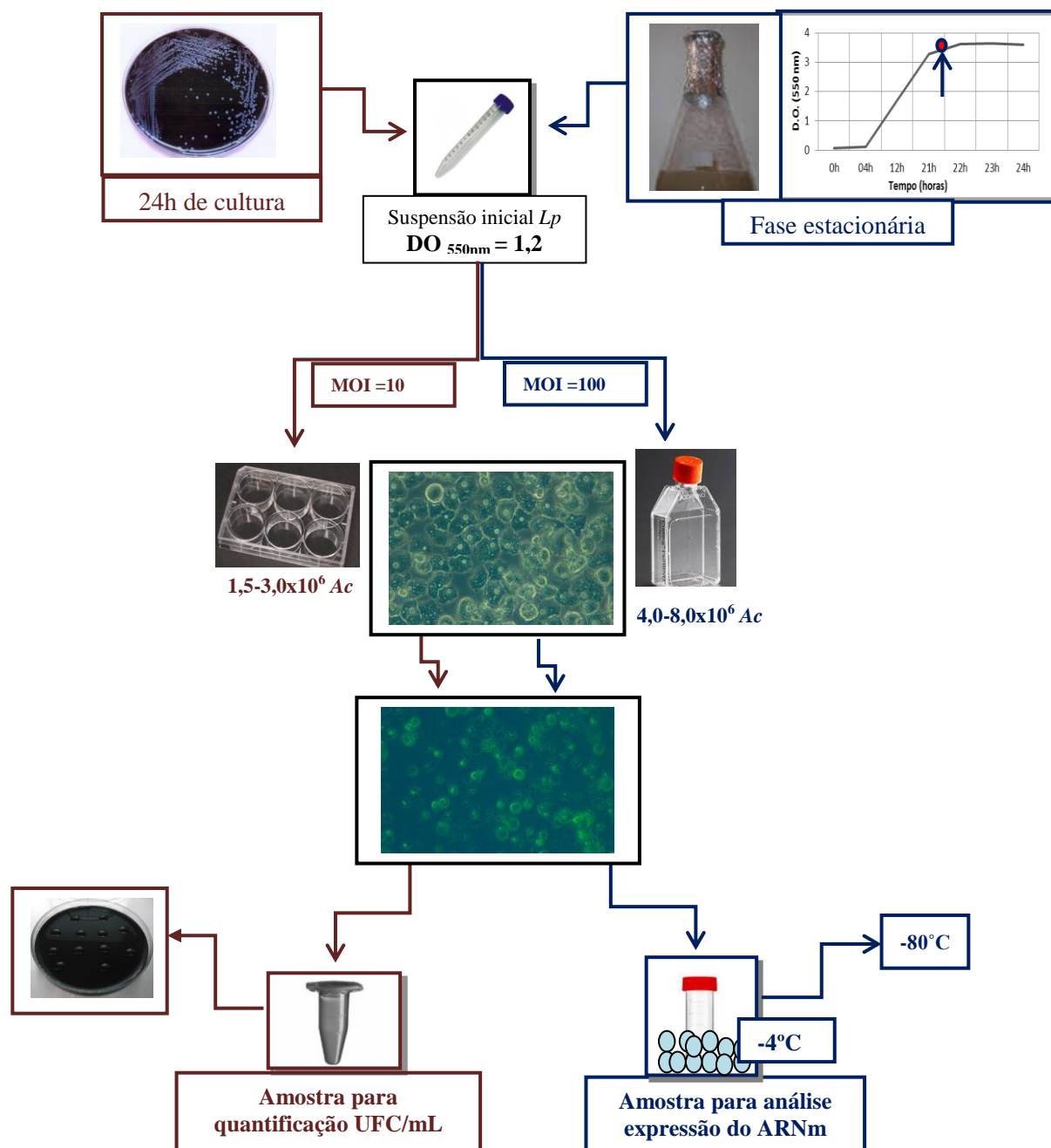
#### **3.1.2.1 Primeiro ciclo de co-cultura**

Antes de iniciar o ciclo de co-cultura Lp-Ac, quantificaram-se as bactérias e as amibas, de modo a que estes ciclos fossem realizados com uma proporção fixa de bactérias para uma amiba (MOI) (24). As amibas foram contadas em câmara de Thomas; quanto à suspensão de bactérias, foi ajustada a uma densidade ótica de 1,2 no espectrofotómetro a 550nm (DO<sub>550nm</sub>). Este valor corresponde a 1,0x10<sup>9</sup> *L. pneumophila*, quantificação prévia através da inoculação, em BCYE- $\alpha$ , de três suspensões com a referida DO<sub>550nm</sub>. Os ciclos de co-cultura Lp-Ac foram realizados a 37°C e após uma hora de contato Lp-Ac, seguida de três lavagens com MMCC para remoção das bactérias não fagocitadas.

Os ciclos de co-cultura Lp-Ac, para os ensaios de internalização e multiplicação e para os ciclos de co-cultura Lp-Ac para a análise da expressão génica diferiram em (Figura 27):

- Os ensaios de internalização e multiplicação foram realizados em placa de seis poços, sendo utilizados dois poços para cada condição, com MOI de 10 e com *L. pneumophila* proveniente de uma cultura em BCYE- $\alpha$  com 24h de incubação a 37°C;
- Os ensaios para a análise da expressão génica foram realizados em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (três frascos para cada condição), com MOI de 100 e com LpP recolhida na fase estacionária de uma cultura líquida em AYE, incubada a 37°C e com agitação de 170 rpm. Foi considerado que uma cultura líquida estava em fase estacionária quando duas leituras consecutivas (intervalo de 30 minutos) de DO<sub>550nm</sub> apresentaram uma variação de ~0,050.

Em cada ciclo de co-cultura Lp-Ac foi realizado um controlo negativo, constituído por um frasco só com amibas sujeito aos mesmos procedimentos que os da co-cultura, exceto a junção de *L. pneumophila*. Este controlo foi realizado para confirmação de que todo o processo era executado em condições de assepsia.



**Figura 27** - Fluxograma de um ciclo de co-cultura Lp-Ac para os ensaios de internalização e multiplicação intracelular (**castanho**) e análise da expressão génica (**azul**)

### 3.1.2.2 Segundo ciclo de co-cultura

No segundo ciclo de co-cultura Lp-Ac o procedimento foi idêntico ao anterior, com a exceção de se terem inoculado 500 $\mu$ L de *L. pneumophila* provenientes do 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac, isto é, *L. pneumophila* que se multiplicou no interior das amibas.

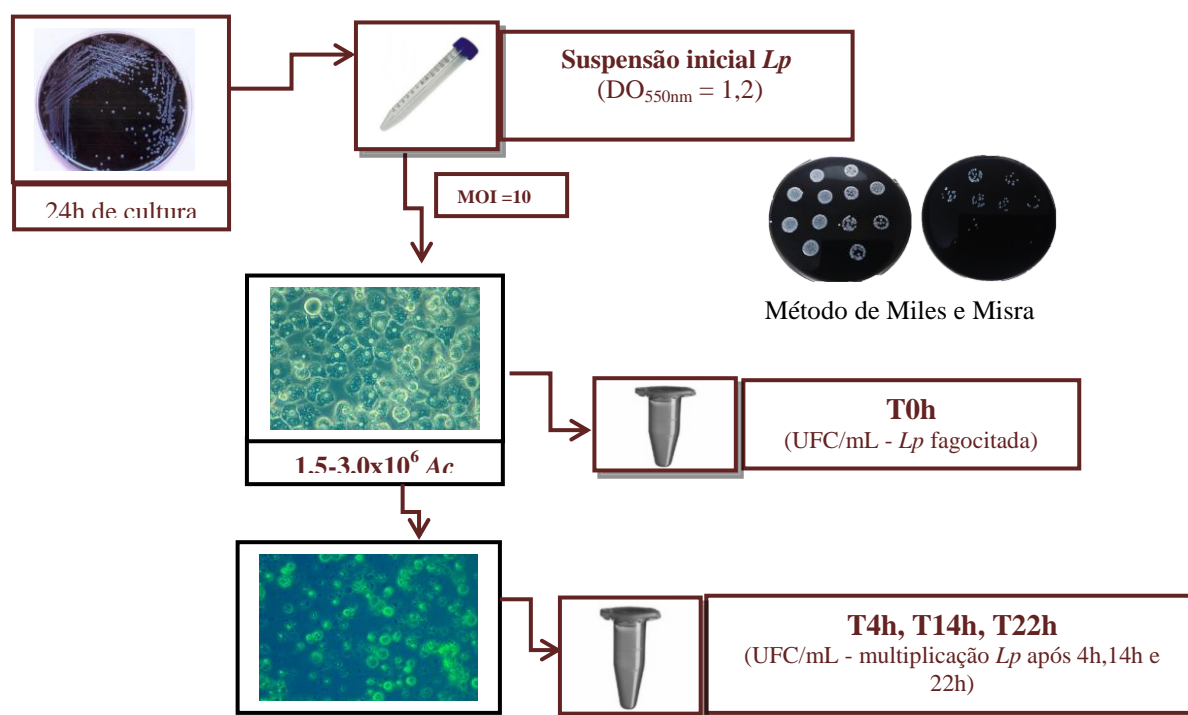
### 3.1.3 Quantificação da *Legionella pneumophila* por inoculação em BCYE- $\alpha$

Os isolados em estudo foram as estirpes *LpP* (ST1), ST100 e ST1905.

Em cada ponto de avaliação (T0h, T4h, T14h, T22h) raspou-se o fundo do poço e recolheu-se 1 ml do seu conteúdo para um microtubo.

De modo a provocar a rotura da membrana das *A. castellanii* agitaram-se os microtubos no agitador Vortex, durante 1 minuto e à velocidade máxima (2500 rpm/minuto), seguido de centrifugação durante 5 minutos a 19000g e de nova agitação, à velocidade máxima. Por fim, para garantir a lise de todas as amibas, passou-se três vezes o conteúdo do microtubo por uma agulha de calibre 27G.

Após diluições sucessivas de 10 vezes em água estéril, efetuou-se a quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs), pelo método de Miles e Misra (136, 207), dispensando, em triplicado, 30  $\mu$ L de cada uma das diluições para placas de BCYE- $\alpha$  (Figura 28).



**Figura 28** - Fluxograma dos ensaios de co-cultura *Lp-Ac* para a determinação da taxa de internalização e multiplicação intracelular: quantificação das UFC/mL

As placas, depois de secas, foram incubadas a 37°C durante 5 dias, sendo observadas em dias alternados para a contagem das UFCs. Nos cálculos foi considerada a diluição cuja contagem se situou no intervalo entre três e 30 UFC/30 $\mu$ L.

Para a determinação das bactérias fagocitadas pelas amibas durante o período de contacto (1h), isto é, os cálculos da taxa de internalização (T0h), utilizou-se a seguinte equação:



$$T0h = \log_{10} \frac{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após período contato com } L. \text{ pneumophila}}{\text{UFC/mL de } L. \text{ pneumophila} \text{ adicionada à monocamada de } A. \text{ castellanii}} \times 100$$

Para os cálculos da taxa de multiplicação às 4h (T4h), 14h (T14h) e 22h (T22h) utilizou-se a seguinte equação:

$$T4h = \log_{10} \frac{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após 4h de co-cultura Lp-Ac}}{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após período contato com } L. \text{ pneumophila}} \times 100$$

$$T14h = \log_{10} \frac{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após 14h de co-cultura Lp-Ac}}{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após período contato com } L. \text{ pneumophila}} \times 100$$

$$T22h = \log_{10} \frac{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após 22h de co-cultura Lp-Ac}}{\text{UFC/mL do lisado de } A. \text{ castellanii} \text{ após período contato com } L. \text{ pneumophila}} \times 100$$

Considerando que a multiplicação no interior da ameba é similar à da fase exponencial de uma cultura líquida, calculou-se o número de gerações durante as 22h de co-cultura Lp-Ac e o tempo de duplicação. Para estes cálculos utilizou-se as seguintes equações:

$$n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2} \quad \text{tg} = t/n$$

**n** = número de gerações no período tempo em análise

**N** = número de bactérias no final do período em análise

**N<sub>0</sub>** = número de bactérias no início do referido em análise

**tg** = tempo de duplicação

**t** = período de tempo em análise

### 3.1.4 Quantificação de *Legionella pneumophila* por citometria de fluxo

Com o objetivo de ultrapassar o tempo de espera da quantificação das UFC/mL em placa (método de referência para contagem de bactérias) testou-se a técnica de citometria de fluxo utilizando quatro fluorocromos diferentes: iodeto de propídio (IP), laranja de tiazol (TO), ester carboxifluoresceína succimidyl (CSFE) e Paul Karl Horan (PKH67).

Numa primeira fase, otimizou-se o protocolo de marcação utilizando diferentes tempos de marcação (3 minutos a 1h) e concentrações de corante (0,4µM a 5µM), em conjugação com *L. pneumophila* viável e morta pela ação do calor (100°C durante 15 minutos). Como controlos de marcação utilizaram-se *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Numa segunda fase comparou-se a quantificação obtida por citometria de fluxo, utilizando o *CellTrace CFSE Proliferation kit* (Invitrogen) versus a obtida pelo método padrão.

Por último, com o objetivo de determinar o MOI para um 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac, testou-se a contagem de *L. pneumophila* em suspensões obtidas após 22h de co-cultura Lp-Ac, isto é,

suspensões com bactérias extracelulares e restos de amibas provenientes do 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac.

Os ensaios foram realizados no citómetro BD FACSCalibur - BD Biosciences e nas quantificações de LpP utilizou-se os *BD Trucount™ Tubes*.

### 3.1.5 Estudo da sensibilidade ao sódio

Para o estudo da sensibilidade ao sódio utilizaram-se suspensões de LpP provenientes de culturas líquidas (fase exponencial e estacionária) e de co-culturas Lp-Ac (1º e 2º ciclo). Após diluições sucessivas de 10 vezes em água estéril, inocularam-se 100µl em placas de BCYE-α e BCYE-α com 100mM NaCl (Anexo VIII), em duplicado. As placas, depois de secas, foram incubadas a 37°C durante 5 dias, sendo observadas em dias alternados para a contagem das UFCs. Nos cálculos foi considerada a diluição cuja contagem se situou no intervalo entre 30 e 300 UFC/100µL. A percentagem de bactérias que foi resistente ao sódio (R<sub>NaCl</sub>) foi calculada pela seguinte equação (26, 255):

$$R_{NaCl} = \text{Log}_{10} \frac{\text{UFC/mL no BCYE-}\alpha \text{ com 100mM NaCl}}{\text{UFC/mL no BCYE-}\alpha} \times 100$$

### 3.1.6 Estudo da sensibilidade osmótica

Para o estudo da sensibilidade osmótica utilizaram-se suspensões de LpP provenientes de cultura líquida (fase exponencial e estacionária) e de co-cultura Lp-Ac (1º e 2º ciclo).

Para cada ponto de avaliação, procedeu-se à transferência de 500µL de suspensão para dois microtubos contendo 500µL de meio AYE e AYE com 0,6M KCl, respetivamente (Anexo VIII). Após incubação das suspensões a 37°C durante 1h, inocularam-se 100µl de diluições sucessivas de 10 vezes em água estéril, em placas de BCYE-α, em duplicado. As placas, depois de secas, foram incubadas a 37°C durante 5 dias, sendo observadas em dias alternados para a contagem das UFCs. Nos cálculos foi considerada a diluição cuja contagem se situou no intervalo entre 30 e 300 UFC/100µL. A percentagem de bactérias osmoticamente resistentes (R<sub>KCl</sub>) foi calculada pela seguinte equação (26):

$$R_{KCl} = \text{Log}_{10} \frac{\text{UFC/mL no BCYE-}\alpha \text{ da amostra incubada em AYE com 0.3M KCl}}{\text{UFC/mL no BCYE-}\alpha \text{ da amostra incubada em AYE}} \times 100$$

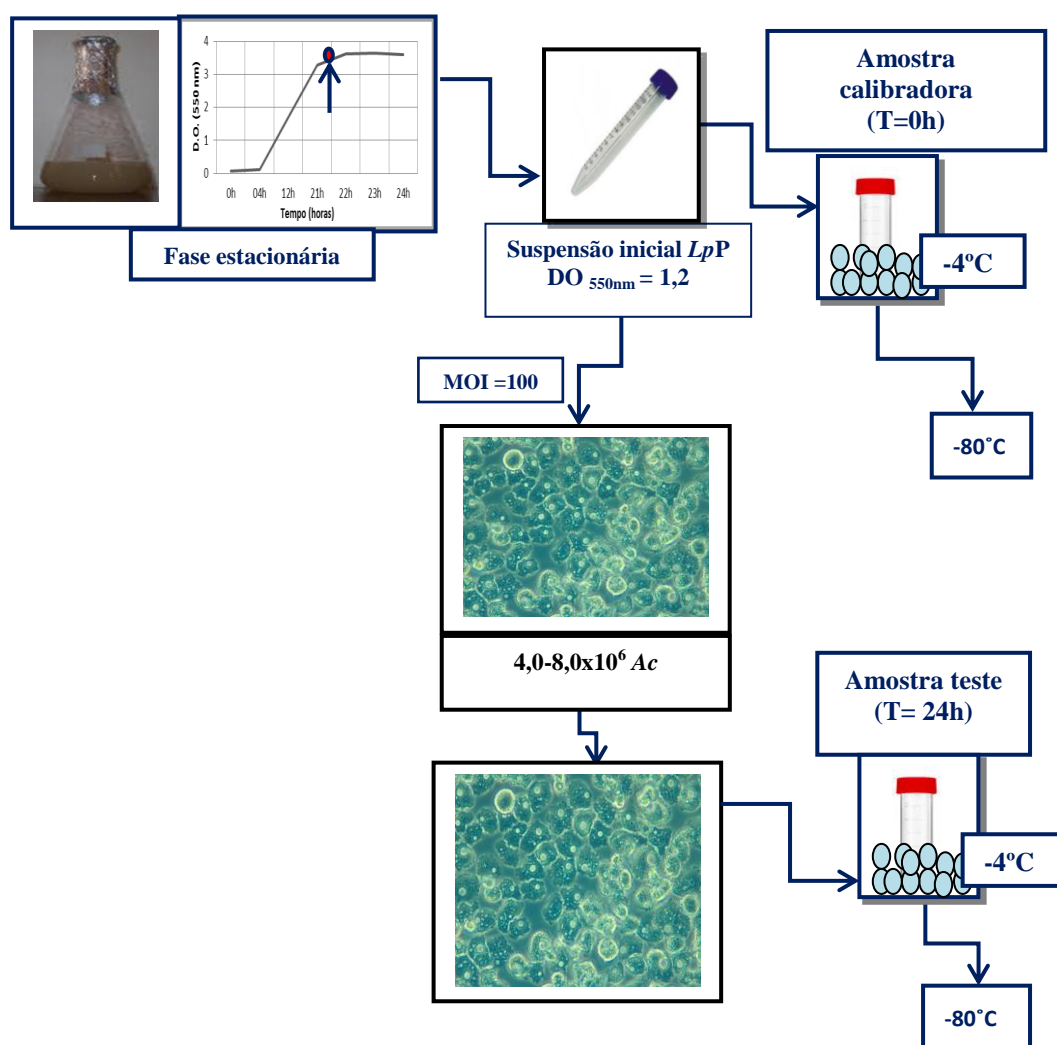
### 3.1.7 Avaliação do transcrito de *Legionella pneumophila* Paris após co-cultura com *Acanthamoeba castellanii*

A análise da expressão da génica de LpP após co-cultura Lp-Ac foi efetuada por *microarrays*, metodologia realizada na UBBI, Paris. A PCR-TR foi utilizada para estudar a expressão do ARNm de genes selecionados entre os que, nos *microarrays*, apresentaram variação. Na avaliação por ambas as metodologias utilizou-se a estirpe LpP e a recolha das amostras foi realizada segundo o fluxograma da figura 29.

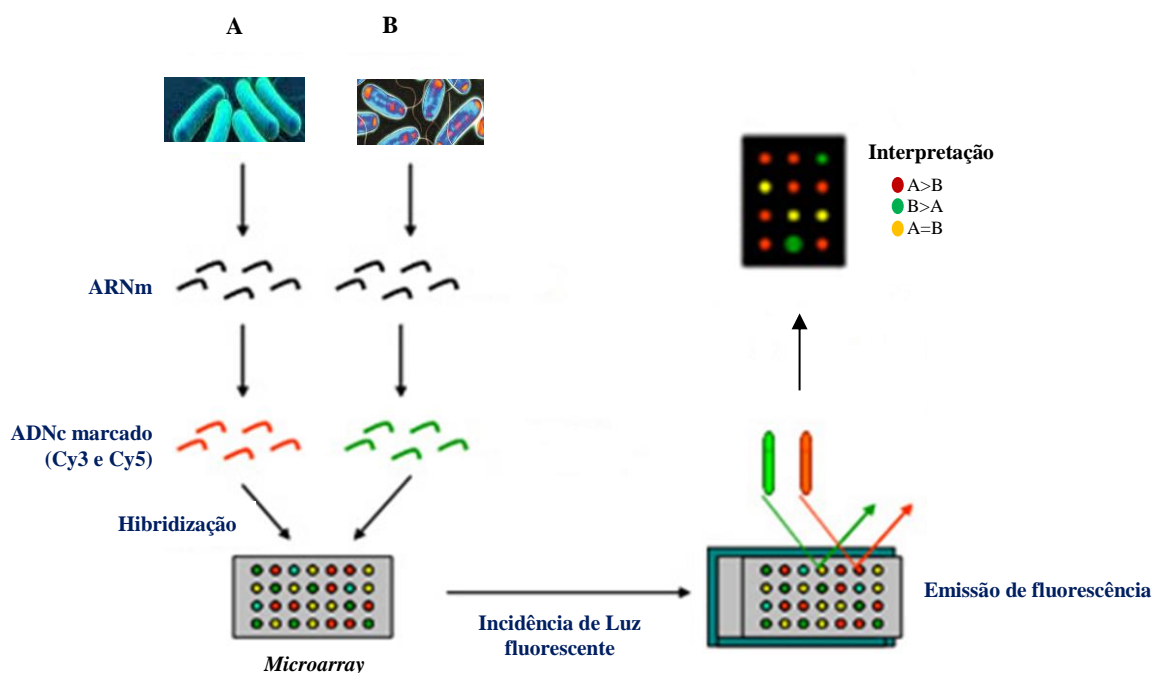
### 3.1.7.1 Avaliação por *microarrays*

O estudo do transcrito envolveu diferentes fases: ensaios de co-cultura Lp-Ac, extração do ARN, transcrição reversa, purificação do ADNc, marcação com cianina3 (Cy3) e cianina5 (Cy5), hibridização com os *microarrays*, leitura e tratamento dos dados.

Esta avaliação envolveu a comparação da expressão de *LpP* antes (amostra calibradora) e após a co-cultura Lp-Ac (amostra teste). Um ponto importante deste procedimento é a recolha das amostras ser rápida e em gelo, para parar a atividade bacteriana. O ensaio de co-cultura Lp-Ac na UBBi foi realizado de acordo com um fluxograma semelhante ao apresentado na figura 29, com exceção do MOI=0,01. No total, foram inoculados 12 frascos de 75cm<sup>2</sup>, para garantir a quantidade de ARN necessária para a avaliação por *microarrays* (Figura 30).



**Figura 29** – Fluxograma de recolha das amostras para o estudo da expressão génica de *LpP* após co-cultura Lp-Ac



**Figura 30** - Fluxograma de um ensaio de avaliação da expressão gênica utilizando *microarrays*.

A – *LpP* da suspensão inicial marcada com Cy5; B – *LpP* após co-cultura *Lp-Ac* marcada com Cy3

O processo de extração do ARN iniciou-se com o rompimento mecânico, sob agitação forte, das bactérias misturadas com esferas de vidro e um detergente, a que se seguiu a junção do trizol (GIBCO BRL), desnaturação das proteínas com o clorofórmio e álcool isoamílico, precipitação do ARN com isopropanol e, por fim, a lavagem com etanol. Para evitar a contaminação com ADN genómico efetuou-se em seguida um tratamento com DNaseI (Sigma-Aldrich).

A transcrição reversa foi realizada com recurso a um kit que paralelamente permite a marcação com Cy3 e Cy5, *SuperScript indirect cDNA labeling system* (Invitrogen), ao qual se adicionou o *p(dN)6* (Roche) para melhorar o rendimento. Nesta fase, a amostra com *LpP* da suspensão inicial foi marcada com Cy5 e a amostra *LpP* obtida após co-cultura *Lp-Ac* com Cy3.

Os *microarrays* utilizados foram construídos com oligonucleótidos de 70mer específicos de todos os genes previstos no genoma da estirpe de *LpP* (CR628336) e do seu plasmídeo (CR628338), num total de 3823 oligonucleótidos. A matriz final foi impressa em lâminas de vidro (UltraGaps (Corning), (24).

De forma resumida, o processo de hibridização foi constituído por quatro fases: preparação das lâminas dos *microarrays* para a hibridização (incubação em tampão constituído por SSC (*saline-sodium citrate*), BSA (*Bovine Serum Albumin*) e SDS (*Sodium dodecyl sulfate*)); lavagens com água e etanol; hibridização (incubação das lâminas em tampão de hibridização constituído por SSC, esperma de salmão, formamida e 250 pmol de ADNc das amostras em estudo marcadas com Cy3 e Cy5); por fim, lavagens sucessivas em três tampões constituídos por SSC e SDS, em concentrações decrescentes. Após o processo de hibridização, as lâminas foram digitalizadas

num GenePix 4000A (Axon Instruments) e os *spots*, que correspondem à fluorescência proveniente das amostras, foram analisados no software Genepix Pro 4.0. Foram considerados alterados os genes cuja expressão teve variação superior a 2 vezes.

### 3.1.7.2 Análise da expressão génica por PCR em tempo real

Como já foi referido, para a avaliação da expressão génica por PCR-TR foi necessário desenhar os *primers* para os genes alvo, implementar a técnica de PCR-TR, efetuar a extração do ARN, tratar com DNase e fazer a síntese do ADNc das amostras calibradora e teste.

Analisou a expressão das estirpes *LpP* (ST1) e E18 (ST100) na fase estacionária, após 1º e 2º ciclos de co-cultura Lp-Ac. As amostras calibradoras foram suspensão na fase exponencial de uma cultura líquida, suspensão na fase estacionária e *L.pneumophila* após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac, respetivamente.

#### 3.1.7.2.1 Seleção dos genes alvo. Desenho e seleção dos *primers*

De entre os genes que apresentaram maiores alterações na expressão do ARNm por *microarrays*, selecionaram-se 17, aqui designados de genes alvo. Dentro destes, nove apresentaram expressão aumentada (*lpp94*, *lpp845*, *lpp1315*, *lpp1316*, *lpp1330*, *lpp1612b*, *lpp2092*, *lpp2607*) sete, expressão diminuída, (*lpp0972*, *lpp1170*, *lpp1177*, *lpp1293*, *lpp1340*, *lpp1900*, *lpp2694*) e dois, não apresentaram variação de expressão (*gyrA* e *lpp3004*) e por isso foram usados como genes de referência.

No desenho dos *primers* para os genes alvo recorreu-se ao programa *Primer Express* versão 3.0, presente no *software* do 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Para a seleção dos *primers*, de entre os vários que foram obtidos procedeu-se, numa primeira fase, ao estudo da especificidade teórica, utilizando o genoma da estirpe *LpP* (Subject ID-gi|54295983|ref|NC\_006368.1) e o programa *basic local alignment search tool* disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Os critérios utilizados nesta análise foram: o *primer* apresentar 100% de homologia apenas com o gene alvo e na extremidade 3' não haver homologias com outras regiões do genoma da *LpP* em mais de 50% do tamanho do *primer*.

Numa segunda fase, os pares de *primers* que passaram a primeira fase foram analisados, utilizando o programa *Gene Runner* versão 3.01, quanto à possibilidade de formação de estruturas secundárias (*Dimers*; *Hairpins*; *Internal loops*; *Bulge loops*) intra e inter cadeias *Forward* e *Reverse*. Foram ainda avaliados os valores de energia livre das ligações formadas (valores positivos indicam baixa estabilidade da ligação).

Numa fase posterior, os *primers* que ultrapassaram as análises anteriores foram submetidos ao BLASTN, para avaliar possíveis homologias teóricas com o genoma completo da *A. castellanii* (Subject ID - gi|11467047|ref|NC\_001637.1|).

### 3.1.7.2.2 Extração do ARN, tratamento com DNase e síntese do ADNc

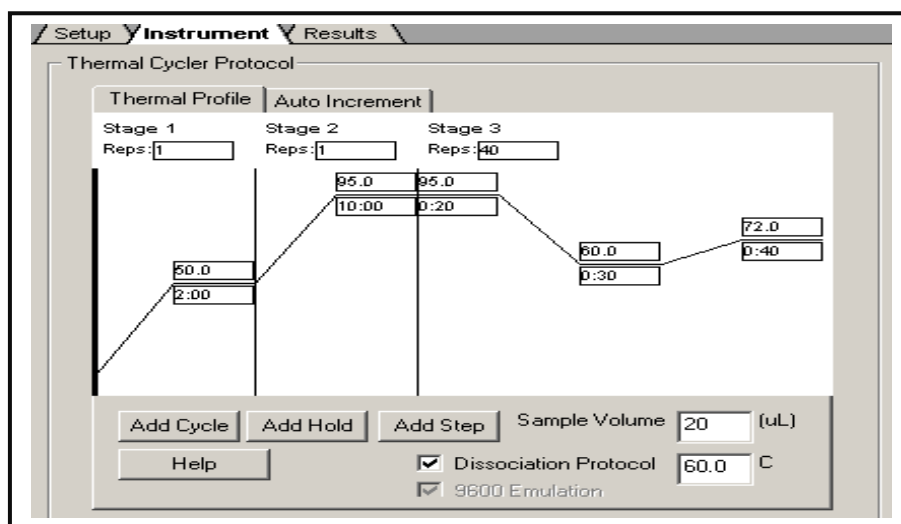
Na extração do ARN das amostras, calibradora e teste (Figura 29), optou-se por utilizar uma técnica mista que combinou a extração manual com trizol e a purificação por coluna com o *PureLink™ RNA Mini kit* (Invitrogen), com o objetivo de aumentar o rendimento. O procedimento usado foi o recomendado pelo fabricante.

No tratamento com DNase utilizou-se a *TUBO DNA free™ kit* (Ambion). O procedimento usado foi o do fabricante com dois pontos de otimização: o volume de DNase foi triplicado, realizando-se dois ciclos de incubação de 30 minutos e em cada um adicionou-se 1,5µL de DNase. O tempo de incubação após a adição do reagente de inativação foi aumentado para o dobro, passando para 10 minutos. A eficácia deste tratamento foi avaliada pela realização de uma sessão de PCR para o gene *mip*, utilizando o protocolo do SBT (descrito no capítulo 2), e os extratos de ARN tratado e não tratado. Usou-se como controlo positivo ADN de *LpP* extraído pelo *kit InstaGene™ Matrix* (Bio-Rad).

Na síntese do ADNc utilizou-se o *SuperScript III kit* (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante, ao qual se adicionou o *p(dN)6* (Roche) para melhorar o rendimento do processo (tal como no procedimento utilizado na UBBI).

### 3.1.7.2.3 Otimização do protocolo da PCR em tempo real

A PCR-TR foi realizada no *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems) utilizando placas de 96 poços (Applied Biosystems), *SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e o programa de amplificação *standard* ao qual se adicionou uma curva de dissociação (Figura 31).



**Figura 31** – Programa da PCR-TR utilizado no estudo da expressão génica de *LpP*

Cada amostra foi analisada em duplicado, num volume final de 20µL. Para excluir a ocorrência de contaminações nas reações de amplificação foi efetuado um controlo negativo por série de PCR-TR. O protocolo da PCR-TR foi alvo de otimização quanto ao volume de amostra do

ADNc e concentração dos *primers*. O protocolo otimizado foi avaliado quanto à sua reprodutibilidade inter e intra-ensaio, linearidade e eficiência.

O estudo da especificidade e sensibilidade dos *primers* foi efetuado após a otimização do protocolo de PCR-TR.

Na otimização do protocolo:

- Testaram-se os *primers* *gyrA* e *lpp1316* nas concentrações de 0,2 e 0,4µM, utilizando o ADN de *LpP* nas concentrações de 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005, 0,00005 e 0,000005 ng/µL;

- Testaram-se os volumes de amostra, 2 e 4µL, utilizando os *primers* *gyrA*, *lpp1330* e *lpp1900*.

Os critérios para a otimização foram o menor valor de *Ct* e de coeficiente de variação.

#### **3.1.7.2.4 Estudo da especificidade analítica dos *primers***

Na avaliação da especificidade dos *primers* utilizaram-se os ADNs de *LpP* e de *A. castellanii*, na concentração de 5ng/µL, extraídos pelo *kit InstaGene™ Matrix* (Bio-Rad) e o *kit QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), respetivamente.

O critério para a avaliação da especificidade foi a análise das curvas de dissociação e a visualização do tamanho dos amplicões em gel de agarose (1,5%).

#### **3.1.7.2.5 Estudo da sensibilidade analítica dos *primers***

Na avaliação da sensibilidade dos *primers* utilizaram-se diluições sucessivas de 10 partindo da concentração de 5ng/µL do ADN de *LpP* (5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005, 0,00005, 0,000005 ng/µL). A última concentração equivale ~1 unidade de genoma (UG).

#### **3.1.7.2.6 Estudo da reprodutibilidade da PCR em tempo real**

Na avaliação da reprodutibilidade inter-ensaio utilizaram-se os *primers* *gyrA*, *lpp1316*, *lpp1900* e testaram-se em triplicado diferentes diluições do ADN de *LpP* (puro, 1/50; 1/100, 1/1000).

#### **3.1.7.2.7 Estudo da linearidade e da eficiência da PCR em tempo real**

Na avaliação da linearidade e da eficiência utilizaram-se os *primers* *gyrA*, *lpp3004*, *lpp1612b*, *lpp1316*, *lpp1330* e *lpp1900* e diluições sucessivas de 10, partindo da concentração de 5ng/µL do ADN de *LpP* (5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005, 0,00005, 0,000005 ng/µL).

Para o estudo da linearidade aplicou-se uma regressão linear à relação entre as variáveis *Ct* versus Log da concentração do ADN.

Para o cálculo da eficiência utilizou-se a equação (68, 233):

$$E = ([10 (-1/\text{declive})] - 1) \times 100$$

### 3.1.7.2.8 Cálculo da expressão génica por PCR em tempo real

Para o cálculo da expressão génica recorreu-se ao método de Livak e Schmittgen ou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que permite a quantificação relativa do gene alvo na amostra teste *versus* a amostra calibradora (182, 295).

Efetuarão-se três repetições biológicas e cada transcrito foi quantificado em duplicado. Na normalização do Ct de cada transcrito utilizou-se a média geométrica dos dois genes de referência selecionados (*gyrA* e *lpp3004*), (291).

Para o cálculo dos valores de expressão génica utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{(GA\ 24h)} - Ct_{(GR\ 24h)}) - (Ct_{(GA\ 0h)} - Ct_{(GR\ 0h)})$$

GA 24h = gene alvo na amostra teste (após 24 horas de co-cultura Lp-Ac)

GA 0h = gene alvo amostra calibradora (*LpP* na fase estacionária)

GR 0h = genes referência na amostra calibradora (*LpP* na fase estacionária)

GR 24h = genes referência na amostra teste (*LpP* após 24 horas de co-cultura Lp-Ac)

Um resultado positivo é indicativo de um aumento na expressão do gene alvo na amostra teste *versus* a amostra calibradora, isto é, aumento da expressão do gene após co-cultura Lp-Ac. Um resultado negativo indicia uma diminuição da expressão.

Só foram considerados significativos os aumentos e diminuições de expressão iguais ou superiores a 2 e iguais e inferiores a -2, respetivamente (167, 255).

### 3.1.8 Análise estatística

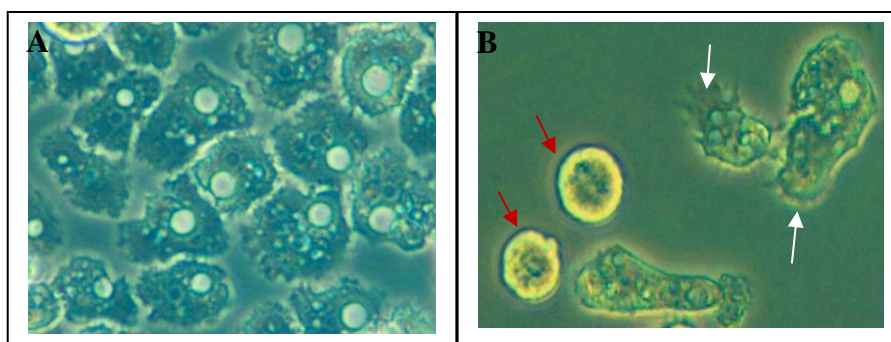
Os resultados apresentaram-se sob a forma de média e desvio padrão e a análise estatística foi realizada pelo *software GraphPad Prism 5* (Windows), utilizando-se o Teste de t-Student para avaliar diferenças estatísticas dos dados, considerou-se que valores de  $p < 0,05$  são estatisticamente significativos. Nos gráficos \* significa que o valor  $p$  é inferior a 0,05.



## 3.2 Resultados

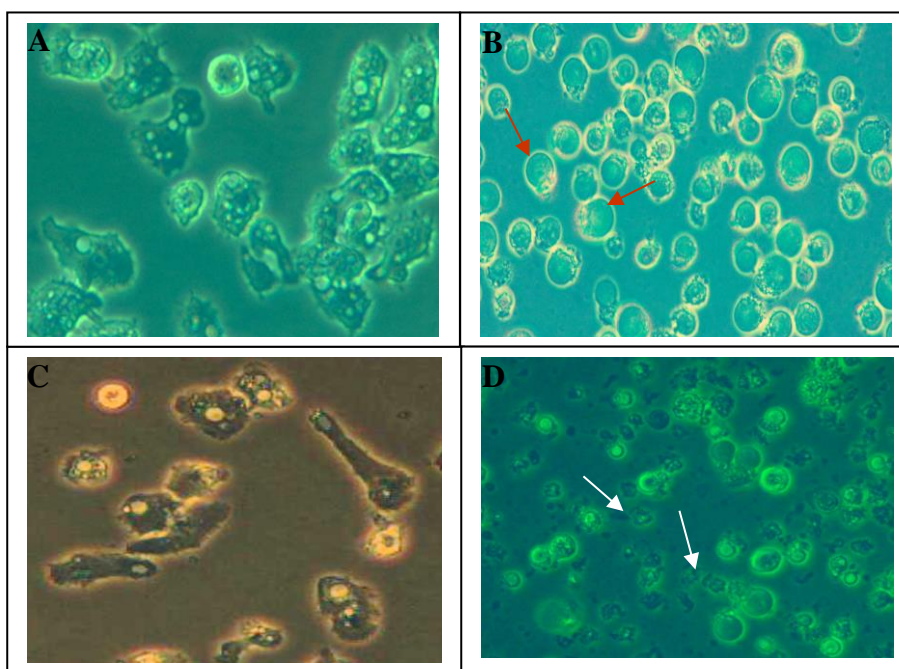
### 3.2.1 Ciclo de co-cultura *Legionella pneumophila*-*Acanthamoeba castellanii*

Na cultura axénica em meio PYG, isto é, cultura sem outros microrganismos vivos e em que os únicos nutrientes são os constituintes do meio, os trofozoítos da *A. castellanii* apresentaram-se aderentes ao fundo do frasco e com uma morfologia característica. Os trofozoítos, organismos unicelulares de forma amebóide e citoplasma com vários grânulos e vacúolos, apresentaram movimentos por pseudópodes e multiplicação por divisão binária (Figura 32A). Quando os nutrientes ou o espaço se tornaram escassos, observou-se a transformação dos trofozoítos em quistos, formas arredondadas que flutuam no meio de cultura, (Figura 32B).



**Figura 32** – Morfologia da *A. castellanii* em meio PYE à temperatura ambiente (microscópio invertido, ampliação 400x). **A** – Camada confluenta de trofozoítos aderentes ao fundo do frasco de cultura, **B** – Quistos soltos (assinalados com a seta vermelho) e pseudópodes (assinalados com seta a branco). Fotos recolhidas durante as subculturas da *A. castellanii*.

Nos ciclos de co-cultura Lp-Ac verificou-se que ~4h após o período de contacto com a *L. pneumophila*, 50 a 75% das amibas apresentavam forma redonda e a maioria tinha perdido a aderência ao substrato; ~14h depois a percentagem de amibas redondas a flutuar aumentou para 70 a 90% (figura B). Nesta fase do ciclo foi visível no interior das amibas um grande vacúolo de replicação repleto de *L. pneumophila* com movimentos circulares rápidos (aqui designados por turbilhões), entre as 22 e 24h; ~90% das amibas presentes no poço sofreu lise, observando-se muitos restos celulares e bacilos extracelulares curtos e providos de movimentos rápidos (Figura 33B e D). Comparativamente, o controlo (amibas em meio MMCC) apresentou pequenas alterações morfológicas, que se resumiram a uma diminuição do volume celular e dos movimentos intracelulares. O número de quistos presentes no poço do controlo, no final do ciclo, foi reduzido, situando-se entre 10 a 20% (Figura 33 A e C).



**Figura 33** – Morfologia durante ciclo de co-cultura Lp-Ac (microscópio invertido, ampliação 400x).

**A** –Controlo às 14h; **B** – Co-cultura Lp-Ac às 14h, visualização do vacúolo de replicação (assinalado com seta a vermelho); **C** – Controlo às 22h; **D** – Co-cultura Lp-Ac às 22h, visível os restos celulares (assinalados com seta a Branco). Fotos recolhidas durante os ciclos de co-cultura Lp-Ac.

### 3.2.2 Quantificação da *Legionella pneumophila* por inoculação em BCYE

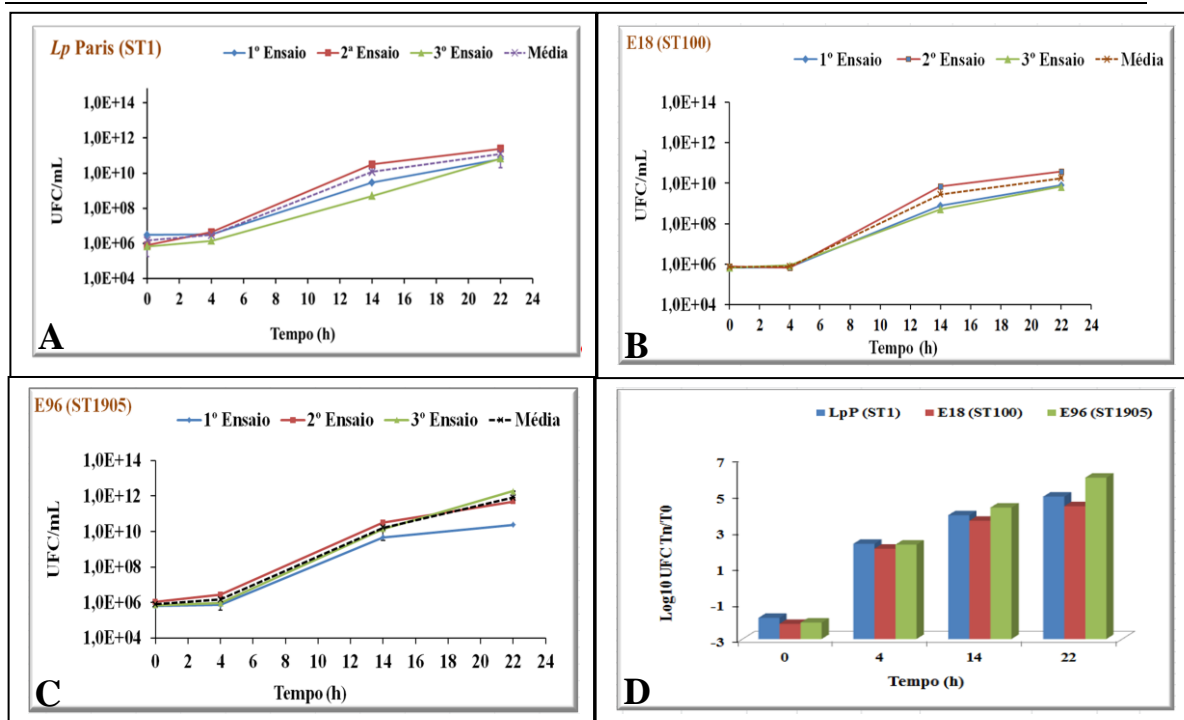
#### 3.2.2.1 Primeiro ciclo de co-cultura Lp-Ac

As três estirpes de *L. pneumophila* (LpP (ST1), E18 (ST100), E96 (ST1905)) apresentaram um comportamento semelhante ao longo dos respetivos ciclos de co-cultura Lp-Ac (Figura 34A, B, C, Anexo IX). O número de bactérias internalizadas foi idêntico para as três estirpes, bem como o ritmo de multiplicação intracelular. A estirpe ST1905, às 22h, apresentava uma taxa de multiplicação mais elevada, no entanto, a diferença não é estatisticamente significativa (Figura 34D).

O número de gerações durante as 10h seguintes à fase de latência, isto é, entre as 4h e as 14h de co-cultura Lp-Ac e o tempo de duplicação de cada uma das três estirpes foi semelhante (Tabela 16).

**Tabela 16** – Número de gerações nas 22h de co-cultura Lp-Ac e tempo de duplicação para as estirpes LpP, ST100 e ST1905

	Nº gerações (10 h co-cultura)	Tempo de duplicação (minutos)
<b>LpP (ST1)</b>	11,9	50
<b>E18 (ST100)</b>	11,8	51
<b>E96 (ST1905)</b>	13,4	45

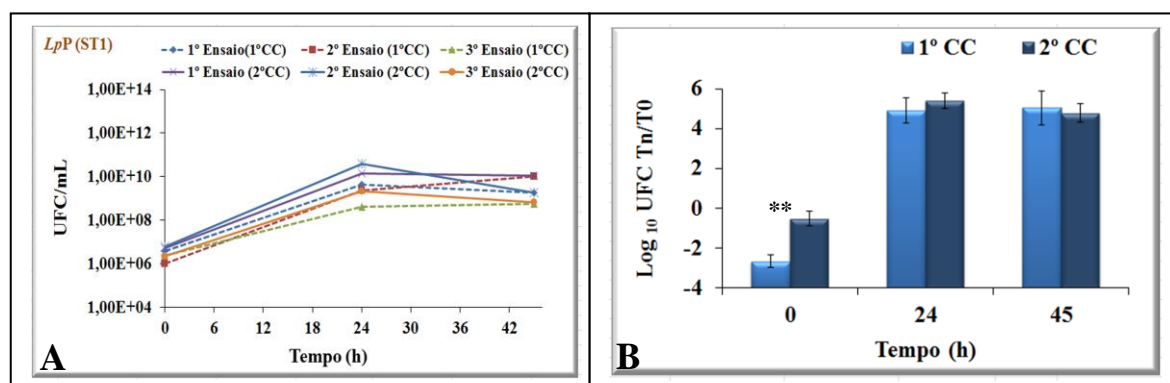


**Figura 34** – Replicação intracelular em *A. castellanii* de três estirpes de *L. pneumophila*.

**A, B, C** – Quantificação avaliada pela inoculação em BCY- $\alpha$ . Resultados expressos em UFC/mL versus o tempo de co-cultura Lp-Ac; só foram representados os desvios padrão no traçado correspondente à média das três réplicas independentes, os restantes estão no anexo IX. **D** – Os valores, expressos em  $\text{Log}_{10} \text{Tn}/\text{To}$ , representam as taxas de internalização (T0h) e respetivas taxas de multiplicação às 4h (T4h), 14h (T14h) e 22h (T22h) de co-cultura Lp-Ac.

### 3.2.2.2 Segundo ciclo de co-cultura Lp-Ac

A replicação intracelular da LpP no 2º ciclo de co-cultura apresenta um comportamento semelhante ao observado no 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac, verificando-se que o número de bactérias é máximo às 24h pós-início da co-cultura Lp-Ac. No entanto, a taxa de internalização do 2º ciclo é superior à do 1º ciclo (Anexo IX). Esta diferença é estatisticamente significativa.



**Figura 35** – Replicação intracelular de LpP no 1º ciclo de co-cultura (1ºCC) e 2º ciclo de co-cultura (2ºCC). **A** – Os valores das UFC/mL apresentados resultam da média dos duplicados de três réplicas independentes. **B** – Os valores, expressos em  $\text{Log}_{10} \text{Tn}/\text{To}$ , representam as taxas de internalização (T0h) e respetivas taxas de multiplicação às 24h (T24h), e 45h (T45h) de co-cultura Lp-Ac. As barras de erro indicam o desvio padrão (\*\*  $p < 0,01$ )

### 3.2.3 Quantificação de *Legionella pneumophila* por citometria de fluxo

A utilização da citometria teve como principal objetivo a diminuição do tempo de quantificação da *L. pneumophila* durante os ciclos de co-cultura Lp-Ac.

Numa primeira fase, tentou-se a marcação da *LpP* antes da inoculação das *A. castellanii*, para que nos pontos de avaliação fosse possível quantificar diretamente as bactérias presentes na amostra, pela medição da fluorescência. Dos fluorocromos testados, as marcações com TO/PI e PKH67/PI revelaram-se inadequadas, dado que a *L. pneumophila*, ao contrário do verificado nos controlos testados (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) apresentou uma marcação heterogénea e sem discriminação entre bactérias vivas e mortas. Não se verificou alteração nos resultados com as diferentes concentrações de PKH67 (1  $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4  $\mu$ M) e tempos de marcação (3 e 5 minutos) testados. O mesmo aconteceu com as concentrações de TO (0,4  $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M) testadas, ambas com o tempo de marcação de 5 minutos. Na marcação com o PI utilizou-se sempre a mesma concentração (48  $\mu$ M) e tempo de marcação (5 minutos).

A marcação com CFSE/PI demonstrou ser homogénea e com uma razoável discriminação entre bactérias vivas e mortas (dados não apresentados). Das concentrações testadas (0,5, 1, 2,5, 5  $\mu$ M) a que apresentou melhores resultados foi a de 5  $\mu$ M e dos tempos de marcação ensaiados (15, 30, 45 minutos, 1h) foi a da 1h a 37°C.

O CFSE não alterou a viabilidade da bactéria, de acordo com a avaliação efetuada pela quantificação das UFC/ml em meio BCYE- $\alpha$  de diluições da suspensão bacteriana antes e após marcação (Tabela 17). No entanto, dado que o CFSE, ao contrário do TO e do PKH67, mostrou perda de fluorescência ao longo do tempo, apesar da marcação eficiente da *LpP*, não foi possível a sua utilização para o objetivo inicialmente proposto.

Na continuação do trabalho, ainda se testou a marcação das bactérias após a recolha em cada ponto de avaliação. Esta marcação implicou um passo prévio de lise da *A. castellanii*, como os restos celulares dificultaram a definição dos *gates* para a leitura, este procedimento foi abandonado.

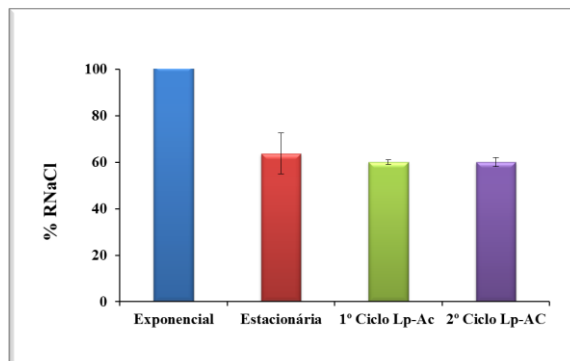
Na quantificação da *LpP* os valores conseguidos por citometria, utilizando os *BD Trucount™ Tubes*, foram discrepantes dos obtidos por inoculação em BCYE- $\alpha$  (Tabela 17).

**Tabela 17** – Contagens de três suspensões de *LpP*: no citómetro (BD FACSCalibur - BD Biosciences) utilizando os *BD Trucount™ Tubes* e por inoculação em BCYE- $\alpha$  (antes e após marcação com CFSE). Os valores apresentados resultam da média de duplicados de um ensaio.

Amostras	Citometria (mL)	UFC/mL	
		Antes CFSE	Após CFSE
<b>A</b>	6,0E+07	2,9E+09	1,9E+09
<b>B</b>	6,0E+06	2,1E+07	3,1E+07
<b>C</b>	3,0E+07	1,8E+06	1,1E+06

### 3.2.4 Estudo da sensibilidade ao sódio

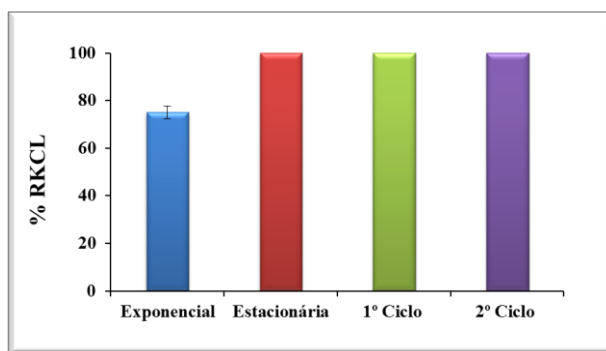
O estudo da sensibilidade ao sódio mostrou que a *LpP* é resistente ao sódio na fase exponencial, passando a sensível na fase estacionária, característica que se manteve após o 1º e 2º ciclos de co-cultura Lp-Ac (Figura 36, Anexo IX).



**Figura 36** – Percentagem de resistência ao sódio da *LpP* em cultura líquida (fase exponencial e estacionária) e após co-cultura Lp-Ac (1º e 2º ciclo). Os valores apresentados resultam da média dos duplicados de duas réplicas independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão.

### 3.2.5 Estudo da sensibilidade osmótica

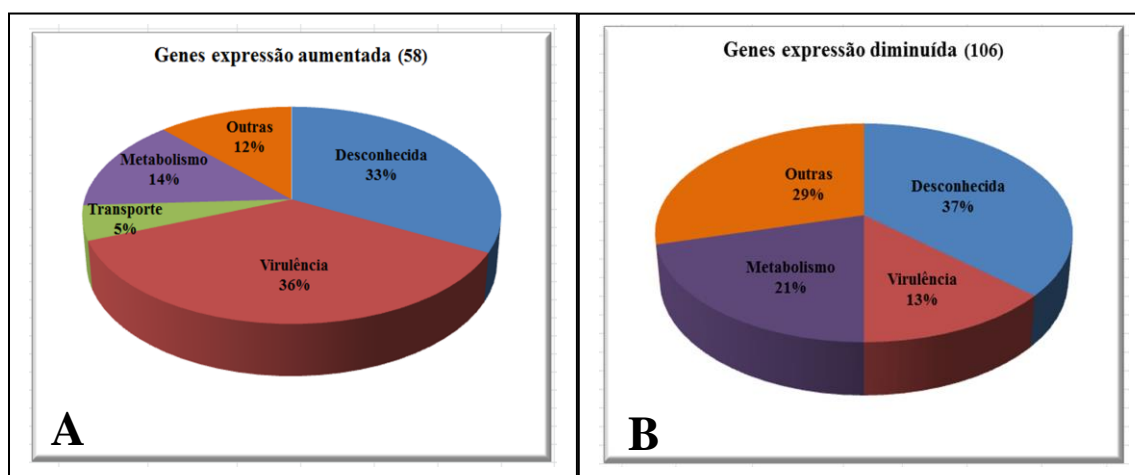
O estudo da sensibilidade osmótica revelou que *LpP* é sensível ao cloreto de potássio na fase exponencial, passando a resistente na fase estacionária, característica que se manteve após o 1º e 2º ciclos de co-cultura Lp-Ac (Figura 37, Anexo IX)



**Figura 37** – Percentagem de resistência osmótica da *LpP* em cultura líquida (fase exponencial e estacionária) e após co-cultura Lp-Ac (1º e 2º ciclo). Os valores apresentados resultam da média dos duplicados de duas réplicas independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão.

### 3.2.6 Avaliação do transcrito por *microarrays* da *Legionella pneumophila* Paris após co-cultura com *Acanthamoeba castellanii*

A análise da expressão génica da LpP após co-cultura Lp-Ac, por *microarrays* (UBBI, Paris), revelou que, relativamente à expressão da amostra calibradora (LpP proveniente da fase estacionária de uma cultura líquida), 120 genes tinham aumentado a expressão, dos quais 58 com valor igual ou superior a 2x, e 232 genes tinham diminuído a sua expressão, dos quais 106 com valor igual ou inferior a 0,5 (Anexo X). A distribuição por categorias funcionais dos genes que sofreram estas alterações é apresentada figura 38. Entre os genes que apresentaram expressão aumentada a maioria pertence à categoria funcional da virulência e entre os que apresentaram expressão diminuída a maioria foi englobada nas categorias que englobam funções desconhecidas ou outras, (Figura 38).



**Figura 38** – Distribuição dos genes que apresentaram alterações após co-cultura Lp-Ac por categorias funcionais: virulência, metabolismo, transporte, outras e desconhecida. **A** – distribuição dos 58 genes com expressão  $\geq 2x$ ; **B** – distribuição dos 106 genes com expressão  $\leq -2x$

Os resultados obtidos resultam de uma única avaliação por *microarrays*: o gene mais expresso foi o lpp1316 (lspG do sistema secretor tipo II) com um valor  $\sim 11x$  superior à expressão obtida com a amostra calibradora, seguido de quatro genes hipotéticos lpp1330, lpp2607, lpp00094 e lpp1612a com resultados  $\sim 6x$  superiores à amostra calibradora. Destacam-se ainda lpp0845 (csrA) com  $\sim 5x$ , e os lpp1315 (lspH), lpp2092 (SdeC), lpp2742 (icmW) e lpp0521 (icmJ/dotN) com  $\sim 3x$ . Entre os genes com expressão diminuída encontraram-se o lpp1294 (flaA) com resultado  $\sim 11x$  inferior à expressão obtida na amostra calibradora, e os lpp1177, lpp1293, lpp1340,  $\sim 5x$  inferiores. Evidenciam-se ainda, entre outros, os genes lpp0972 (similar enhA) e lpp1170 (do domínio GGDEF e EAL),  $\sim 4x$  inferiores, e ainda o lpp2694 (enhA) com  $\sim 3x$  inferior.

### 3.2.7 Análise da expressão genética por PCR em tempo real

#### 3.2.7.1 Seleção dos genes alvo. Desenho e seleção dos *primers*

Na fase de desenho dos *primers* e considerando as condições e critérios estabelecidos ( $T_m=60 \pm 2^\circ\text{C}$ , comprimento de 20 a 40 bases, conteúdo de GC entre 30 e 80%, formação de um produto de PCR entre 140 e 300 pb e sem sequências consecutivas de nucleótidos repetidos) selecionaram-se para os 17 genes em estudo 188 *primers*, que foram analisados quanto à sua especificidade teórica para o genoma da *LpP* utilizando o BLAST (exemplo no Anexo XI). Na sequência desta análise, rejeitaram-se 152 *primers* por apresentarem homologias noutras regiões do genoma que não o gene alvo ou com ligações na região 3' superiores a 50% do seu tamanho (critérios de rejeição). Em consequência das restrições impostas, não foi possível obter nenhum par de *primers* para os genes *lpp2092* (expressão aumentada) e *lpp1293* (expressão diminuída), tendo por isso sido abandonado o seu estudo.

A análise dos 36 pares de *primers*, selecionados na fase anterior, pelo programa Gene Runner, quanto à formação de estruturas secundárias (*Hairpin*, *Dimers*; *Internal loops*; *Bulge loops*) e valores da energia livre das ligações formadas (exemplo no Anexo XI), permitiu selecionar os 15 pares de *primers* necessários para prosseguir o estudo. A seleção recaiu sobre os pares que apresentaram o menor número de estruturas secundárias e com valores de energia livre mais elevados.

Por último, recorrendo ao BLASTN, avaliou-se se os pares de *primers* selecionados apresentavam alguma homologia teórica com o genoma da *A. castellanii*.

Nesta análise, nenhum par de *primers* apresentou homologia teórica com o referido genoma.

**Tabela 18** – *Primers* selecionados para a avaliação da expressão génica da *L. pneumophila* por PCR-TR. São referenciados o gene alvo e respetiva posição no genoma da *LpP* (NC\_006368.1), sequências dos *primers*, posição no gene e tamanho do amplicão.

Genes	Posição genoma	Primers	Sequências (5'-3')	Posição gene	Amplicões (bp)
lpp0094	97375-98142	lpp0094F	TAATCCTCTGGTGGGCTCGA	97449-97468	158bp
		lpp0094R	TTCCACATCGGTGATACGAAC	97606-97585	
lpp0845	947459-947668	lpp0845F	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT	947478-947500	165bp
		lpp0845R	CAGATTCTTTTCTTGTTGTATGCG	947645-947621	
lpp0972	1076650-1077247	lpp0972F	CCTGAGAAAAAGACAGGCCACA	1076797-1076817	145pb
		lpp0972R	GTCTGCCAACGTCCTCACAA	1076941-1076922	
lpp1170	c1304318-1302012	lpp1170F	ATTGAAAGCGCTGCATACCTT	1303949-1303930	155pb
		lpp1170R	TTATTAGCGCCTGCATGCAC	1303795-1303814	
lpp1177	c1305825-1304470	lpp1177F	TGCATGATGCTGCTTGTTGGT	1305188-1305169	145pb
		lpp1177R	TAGGCCGCATACCCACTAC	1305044-1305063	
lpp1315	c1469180-1468695	lpp1315F	TTTAGAAAGCAGCACCCTTGG	1469007-1468987	145bp
		lpp1315R	AAGGCTAATCACAACGTTTGG	1468863-1468885	
lpp1316	c1469589-1469167	lpp1316F	CGGATGAAGCCCGTAAAGTC	1469489-1469470	150bp
		lpp1316R	TTGGAACAGGATTGCTTGAGGT	1469340-1469362	
lpp1330	1485268-1486245	lpp1330F	GGTGAGCATGCTAAGGTGCA	1485454-1485473	140bp
		lpp1330R	TGTTTATCCAAGGCCACAGT	1485593-1485573	
lpp1340	c1496234-1495857	lpp1340F	ATCCAATGCTGAGGACACAGC	1496172-1496152	165pb
		lpp1340R	GTCACGCATTGTTTATAAGTCA	1496008-1496029	
lpp1612b	c1798220-1797582	lpp1612bF	CGATGATGCTGTGATTCCACA	1797936-1797916	145bp
		lpp1612bR	CAACCCTGGTTTCGCAAGAG	1797792-1797811	
lpp1900	2149421-2152066	lpp1900F	ACAGATGCTATAGGCGGGTATTG	2150555-2150577	160pb
		lpp1900R	GCCCATGACGGGTATGTTTC	2150714-2150695	
lpp2607	c2971433-2970606	lpp2607F	TACAACGCGGTAACGAAGGAT	2970994-2970974	160bp
		lpp2607R	GCCATGTCTTTGCCTAACCGT	2970835-2970855	
lpp2694	c3074007-3073285	lpp2694F	CTATAGGCAGAGGCGGTGCA	3073520-3073501	145pb
		lpp2694R	TCGTTTAACCACTTGGCATCCT	3073376-3073397	
gyrA	1527474-1530065	gyrAF	ATGCTATGCTCCCTGTCCGT	1529368-1529387	161pb
		gyrAR	GACTCCGACGAGGCTGTCAT	1529528-1529509	
lpp3004	3422616-3424010	lpp3004F	GAGCGGATGGAAGTGGTGAT	3422098-3422079	135pb
		lpp3004R	ATTTGATTCCGCCACATTG	3421926-3421945	

### 3.2.7.2 Otimização do protocolo da PCR em tempo real

O protocolo foi otimizado quanto à concentração de *primers* e volume de amostra a utilizar.

Os resultados obtidos com as duas concentrações de *primers* testadas 0,2µM e 0,4µM são semelhantes pelo que se optou pela concentração mais baixa, 0,2 µM (Tabela 19).



**Tabela 19** – Resultados do ensaio de otimização da concentração dos *primers*. O desempenho das concentrações testadas, [0,2µM] e [0,4µM], foi avaliado pelo Cv dos duplicados das reações de PCR-RT utilizando dois genes e sete concentrações de ADN de *LpP*.

<i>Primers</i>	Amostra [ADNc] (ng/ µL)	<i>Primers</i> [0,2µM]		<i>Primers</i> [0,4µM]	
		Ct <sup>a</sup>	Cv (%)	Ct	Cv (%)
gyrAF+R	<i>LpP</i> [5]	17,1	0,7	16,9	1,5
lpp1316F+R		17,7	1,8	17,0	0,3
gyrAF+R	<i>LpP</i> [0,5]	20,1	1,3	20,0	0,1
lpp1316F+R		20,5	0,1	20,2	0,3
gyrAF+R	<i>LpP</i> [0,05]	23,8	1,4	23,9	2,5
lpp1316F+R		24,3	0,8	23,7	1,2
gyrAF+R	<i>LpP</i> [0,005]	27,3	0,4	26,2	0,2
lpp1316F+R		26,8	1,3	26,1	0,0
gyrAF+R	<i>LpP</i> [0,0005]	29,5	0,8	29,4	1,3
lpp1316F+R		30,4	0,02	29,3	0,0
gyrAF+R	<i>LpP</i> [0,00005]	31,3	1,8	30,7	0,5
lpp1316F+R		31,9	0,9	31,6	2,2
gyrAF+R	<i>LpP</i> [0,000005]	32,8	1,1	33,2	4,0
lpp1316F+R		33,4	1,8	32,9	1,5

<sup>a</sup> – Média Cts

Cv– Coeficiente de variação

Quanto ao volume da amostra, os resultados (tabela 20) mostram que com o volume de 2µL se obteve um Ct similar ao do volume de 4µL, pelo que se optou pelo menor volume para prosseguir o estudo.

**Tabela 20** - Resultados do ensaio de otimização do volume de ADN. O desempenho do volume de 2µL *versus* o volume de 4µL foi avaliado pelo Cv dos duplicados das reações de PCR-RT, utilizando quatro amostras diferentes de ADN de *LpP* e três pares de *primers*.

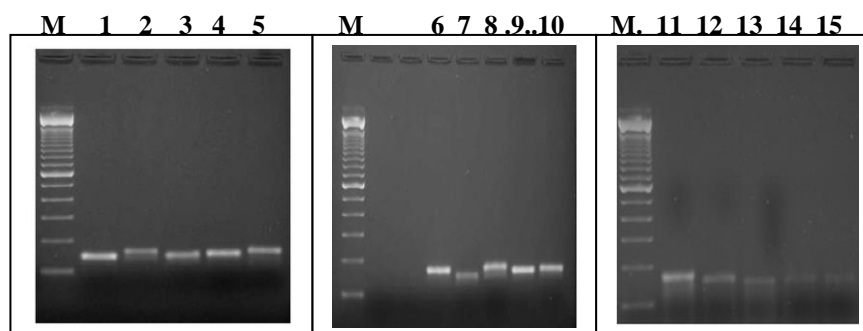
<i>Primers</i>	Amostra	Amostra (2µL)			Amostra (4µL)		
		Ct	Ct	Cv (%)	Ct	Ct	Cv (%)
gyrAF+R	7	25,4	25,7	0,9	25,0	27,0	5,4
lpp1330F+R		27,5	27,6	0,5	26,2	26,7	1,3
lpp1900F+R		25,1	25,8	1,9	24,2	25,0	2,3
gyrAF+R	9	22,7	22,5	0,6	22,1	22,8	2,2
lpp1330F+R		21,2	24,2	9,4	21,3	20,8	1,7
lpp1900F+R		23,8	23,8	0,6	22,4	22,6	0,6
gyrAF+R	11	30,6	30,8	0,5	30,6	30,8	0,5
lpp1330F+R		29,2	29,3	1,0	28,8	28,0	2,0
lpp1900F+R		27,8	26,8	2,6	27,6	26,0	4,2
gyrAF+R	15	21,5	22,0	1,6	20,0	20,8	2,8
lpp1330F+R		27,4	27,8	0,5	26,8	27,4	1,6
lpp1900F+R		28,4	29,0	1,5	28,4	28,8	1,0

### 3.2.7.3 Estudo da especificidade analítica dos *primers*

A análise das curvas de dissociação das reações de PCR-TR com o ADN de *LpP* permitiu determinar as temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) para cada um dos *primers* selecionados e referidos no ponto 3.1.7.2.1 (Tabela 21). As curvas apresentaram um pico único, não se visualizaram dímeros e na eletroforese em gel de agarose a 1,5% visualizaram-se as bandas com o tamanho esperado, referido na Tabela 18.

**Tabela 21** – Temperatura de *melting* específica de cada par de *primers* utilizando ADN de *LpP* [5ng/ $\mu$ L]

<i>Primers</i>	$T_m$	<i>Primers</i>	$T_m$	<i>Primers</i>	$T_m$	<i>Primers</i>	$T_m$
lpp0094F+R	79	lpp1177F+R	82	lpp1340F+R	77	lpp2694F+R	79
lpp0845F+R	76	lpp1315F+R	76	lpp1612bF+R	78	GyrAF+R	80
lpp0972F+R	80	lpp1316F+R	77	lpp1900F+R	77	lpp3004F+R	80
lpp1170F+R	79	lpp1330F+R	77	lpp2607F+R	79		



**Figura 39** – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de amplificação referentes aos 16 genes em estudo, M-marcador de 100pb; 1-lpp1330; 2-lpp0094; 3-lpp1315; 4-lpp1177; 5-lpp1170; 6-lpp207; 7-lpp3004; 8-lpp0845; 9-lpp1900; 10-lpp1340; 11-gyrA; 12-lpp1316; 13-lpp1612b; 14-lpp0972; 15-lpp2694

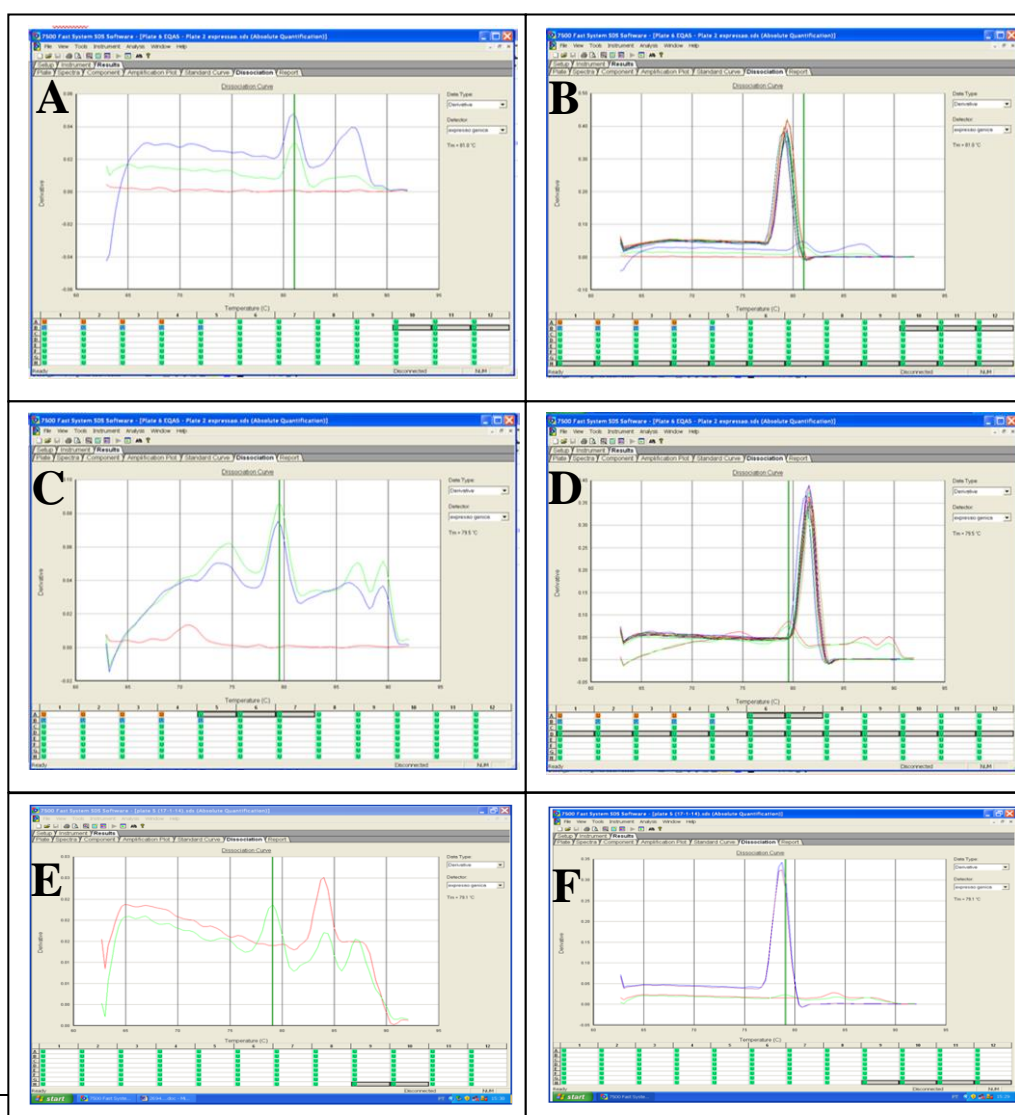
Foram igualmente testados todos os *primers* com ADN de *A. castellanii*. Este ponto foi considerado importante porque as amostras obtidas a partir da co-cultura Lp-Ac estão “contaminadas” com ADN do hospedeiro, pelo que é fundamental garantir que os *primers* não originam amplificação na presença deste ADN. Assim, a ausência de sinal quando o ADN da *A. castellanii* está presente, permite validar os resultados obtidos nas amostras recolhidas durante o ciclo de co-cultura Lp-Ac, e associar os valores obtidos, unicamente, ao gene alvo da *LpP*. Nesta avaliação, os *primers* lpp1177 e lpp2694 apresentaram amplificação com o referido ADN, com  $C_t=36,5$  e  $C_t=37,9$ , respetivamente. Nas curvas de dissociação verificaram-se, em ambos os casos, picos a 79 °C, valor igual ao obtido com o ADN de *L. pneumophila*. Por estas razões estes dois *primers* foram abandonados.

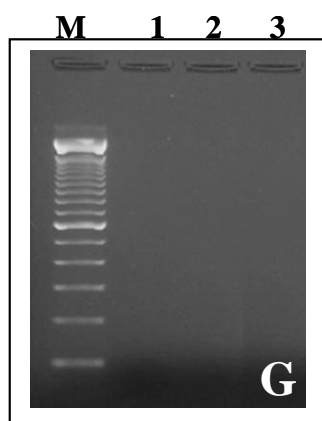
**Tabela 22** – Resultados do estudo da especificidade analítica dos primers utilizando ADN *LpP* e *Castellanii* [5ng/μL]

<i>Primers</i>	Ct <sup>a</sup> (ADN <i>LpP</i> )	Ct (ADN <i>A.Castellanii</i> )	<i>Primers</i>	Ct (ADN <i>LpP</i> )	Ct (ADN <i>A.Castellanii</i> )
lpp0094F+R	17	S/A	lpp1340F+R	15	S/A
lpp0845F+R	17	S/A	lpp1612BF+R	18	S/A
lpp0972F+R	18	S/A	lpp1900F+R	15	S/A
lpp1170F+R	15	39,0	lpp2607F+R	15	S/A
lpp1177F+R	15	36,5	lpp2694F+R	17	37,9
lpp1315F+R	15	S/A	GyrAF+R	17	S/A
lpp1316F+R	17	S/A	lpp3004F+R	17	S/A
lpp1330F+R	15	S/A			

<sup>a</sup> Média de duplicados  
S/A Sem amplificação

Nos resultados duvidosos (genes lpp1170, lpp1177 e lpp2694 - assinalados a cinzento na tabela 22), foram repetidas as PCRs, reavaliadas as curvas de amplificação e dissociação e visualizados os amplicões em gel de agarose (1,5%) (Figura 40).





**Figura 40** – Reavaliação dos *primers* lpp1170F+R, lpp1177F+R, lpp2694F+R.

**A, C, E** - Curvas de dissociação após amplificação do ADN de *A. castellanii* [5ng/mL], com os *primers*: lpp1170F+R; lpp1177F+R e lpp2694F+R, respetivamente;

**B, D, F** - Curvas de dissociação obtidas após amplificação do ADN *LpP* [5ng/mL] pelos *primers* em avaliação, emparelhadas com as curvas A, C, E, respetivamente.

A linha verde assinala o posicionamento do pico correspondente à amplificação de cada um dos três *primers* em avaliação.

**G** – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicões dos três *primers* em avaliação com *A. castellanii*: M- Marcador de 100pb, 1 - lpp1170F+R; 2 - lpp1177F+R; 3 - lpp2694F+R.

Esta nova reavaliação dos três pares de *primers* permitiu confirmar que a amplificação do ADN de *A. castellanii*, para além de ter um Ct muito elevado, corresponde a um amplicão cuja curva de dissociação é diferente da obtida para o mesmo par de *primers* quando se utiliza o ADN da *LpP* (Figura 40B, D, F). Na eletroforese não se visualizou nenhuma banda, confirmando a baixa quantidade de amplicão gerado. Face a estes resultados, foram validados estes pares de *primers*.

### 3.2.7.6 Estudo da sensibilidade analítica dos *primers*

No estudo da sensibilidade, a maioria (10/15) dos pares de *primers* amplificou até à diluição correspondente a 1 UG (~5fg), quatro pares de *primers* até 10 UG e um até à 100 UG (Tabela 23).

**Tabela 23** – Resultados do estudo da sensibilidade obtidos a partir de diluições sucessivas de ADN de *LpP* desde [5ng/mL] a [5fg/mL].

Primers	Sensibilidade	Primers	Sensibilidade	Primers	Sensibilidade
lpp0094F+R	10 UG	lpp1315F+R	1 UG	lpp1900F+R	10 UG
lpp0845F+R	1 UG	lpp1316F+R	1 UG	lpp2607F+R	1 UG
lpp0972F+R	1 UG	lpp1330F+R	10 UG	lpp2694F+R	100 UG
lpp1170F+R	1 UG	lpp1340F+R	1 UG	GyrAF+R	1 UG
lpp1177F+R	10 UG	lpp1612bF+R	1 UG	lpp3004F+R	1 UG

### 3.2.7.7 Estudo da reprodutibilidade da PCR em tempo real

Os coeficientes de variação obtidos no estudo da reprodutibilidade inter-ensaio situaram-se entre 1,2 e 3,6%, tendo a maioria (7/12) um valor ~2,5%. Na reprodutibilidade intra-ensaio os coeficientes de variação situaram-se entre 0,0 e 6,0%, a maioria (19/35) esteve abaixo de 1% (Tabela 24).

**Tabela 24** – Resultados do estudo da reprodutibilidade inter-ensaio e intra-ensaio utilizando ADN *LpP* puro, diluído a 1/50, 1/100 e 1/1000

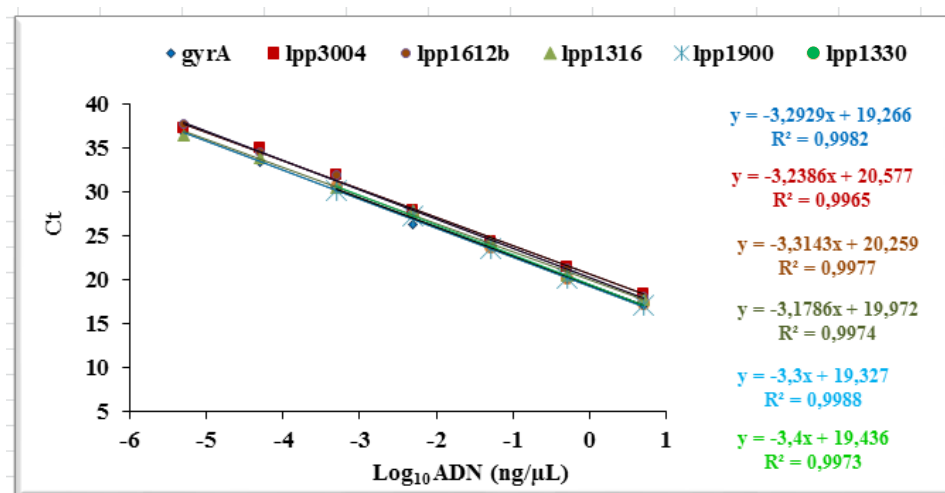
<i>Primers</i>	<i>Amostra</i>	1º Ensaio		2º Ensaio		3º Ensaio		<i>Cv<sup>b</sup></i> (%)
		<i>Ct</i>	<i>Cv<sup>a</sup></i> (%)	<i>Ct</i>	<i>Cv<sup>a</sup></i> (%)	<i>Ct</i>	<i>Cv<sup>a</sup></i> (%)	
gyrAF+R	<i>LpP</i>	22,7	<b>0,3</b>	21,6	<b>0,3</b>	21,7	<b>5,0</b>	<b>2,6</b>
		22,6		21,6		22,0		
		22,6		21,5		23,8		
	<i>LpP</i> 1/50	28,3	<b>1,0</b>	27,4	<b>0,6</b>	27,5	<b>5,9</b>	<b>3,6</b>
		28,3		27,1		27,3		
		28,8		27,1		24,7		
	<i>LpP</i> 1/100	29,6	<b>0,2</b>	28,2	<b>0,4</b>	29,4	<b>0,3</b>	<b>2,5</b>
		29,7		28,3		29,6		
		29,6		28,4		29,5		
	<i>LpP</i> 1/1000	33,1	<b>1,7</b>	33,6	<b>6,0</b>	34,1	<b>2,9</b>	<b>2,3</b>
		33,0		36,5		33,2		
		32,1		32,5		32,2		
lpp1316F+R	<i>LpP</i>	23,1	<b>0,3</b>	23,6	<b>3,2</b>	23,2	<b>1,4</b>	<b>1,9</b>
		23,0		24,8		23,8		
		23,0		23,4		23,7		
	<i>LpP</i> 1/50	28,3	<b>0,2</b>	26,8	<b>1,3</b>	28,4	<b>0,4</b>	<b>2,9</b>
		28,4		26,8		28,4		
		28,4		27,4		28,6		
	<i>LpP</i> 1/100	29,8	<b>0,7</b>	30,7	<b>0,0</b>	31,0	<b>0,4</b>	<b>2,3</b>
		29,6		30,7		30,8		
		29,4		30,7		31,0		
	<i>LpP</i> 1/1000	32,9	<b>1,2</b>	33,5	<b>2,9</b>	34,1	<b>0,8</b>	<b>1,7</b>
		33,2		35,4		34,1		
		33,7		34,0		34,6		
lpp1900F+R	<i>LpP</i>	27,1	<b>0,7</b>	27,6	<b>2,8</b>	27,2	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>
		26,9		27,8		27,8		
		26,7		26,4		27,7		
	<i>LpP</i> 1/50	31,3	<b>0,2</b>	31,4	<b>1,0</b>	32,4	<b>0,8</b>	<b>2,7</b>
		31,4		30,8		32,9		
		31,4		30,9		32,6		
	<i>LpP</i> 1/100	32,8	<b>0,6</b>	31,7	<b>1,2</b>	33,0	<b>1,2</b>	<b>3,4</b>
		32,6		31,0		33,8		
		32,4		31,2		33,6		
	<i>LpP</i> 1/1000	35,5	<b>1,2</b>	34,5	<b>0,9</b>	36,1	<b>0,9</b>	<b>2,7</b>
		35,2		34,4		36,7		
		34,7		35,0		36,6		

*Cv<sup>a</sup>* – Coeficiente de variação intra-ensaio

*Cv<sup>b</sup>* – Coeficiente de variação inter-ensaio

### 3.2.7.8 Estudo da linearidade e da eficiência da PCR em tempo real

Na avaliação da linearidade os seis pares de *primers* analisados apresentaram  $R^2$  de 0,99 e os declives das retas de regressão variaram entre -3,4 e -3,2 (Figura 41). O cálculo da eficiência apresentou um valor de 98% para todos os pares de *primers* estudados.



**Figura 41** – Regressão linear entre a variável Ct e  $\text{Log}_{10}$  da concentração de ADN. Cálculo do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e declive da reta para determinação do valor da eficiência.

### 3.2.7.9 Cálculo da expressão génica por PCR em tempo real

No estudo da expressão génica utilizou-se o protocolo que foi otimizado no decurso do presente trabalho:

10  $\mu\text{L}$  SYBER Green PCR Master Mix  
 2  $\mu\text{L}$  primer F [0,2  $\mu\text{M}$ ]  
 2  $\mu\text{L}$  primer R [0,2  $\mu\text{M}$ ]  
 2  $\mu\text{L}$  amostra  
 4  $\mu\text{L}$  água ultra pura livre de DNases e RNases

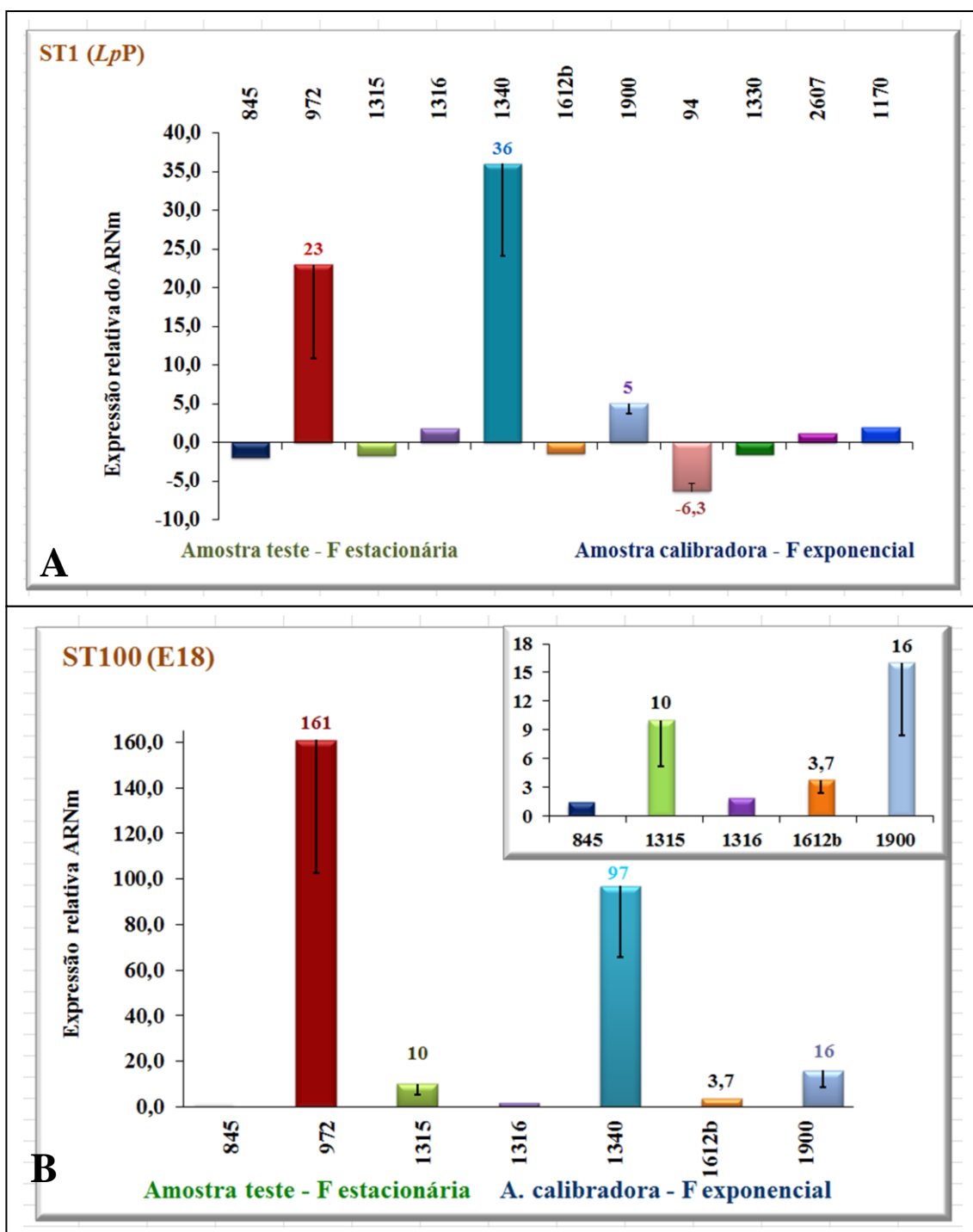
Para os cálculos da expressão relativa recorreu-se a uma folha de Excel e utilizou-se o modelo matemático  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

No estudo utilizaram-se duas estirpes de *L. pneumophila*, uma estirpe LpP (ST1) e uma estirpe E18 (ST100). Numa primeira fase, verificou-se se todos os *primers* selecionados amplificavam com a estirpe ST100. Os resultados revelaram que os *primers* lpp0094, lpp1170 e lpp1330 não amplificavam, e que o lpp2607 amplificava mas com um valor de Ct elevado (Ct=33), comparativamente com o resultado obtido com ST1, que com a concentração de ADN testada, [5ng/ $\mu\text{L}$ ], tinha amplificação no ciclo 18 (Ct=18). Por estas razões, estes genes não foram alvo de estudo com a estirpe ST100.

Avaliando a expressão das duas estirpes na fase estacionária de uma cultura líquida, comparativamente com a amostra calibradora (neste caso a bactéria na fase exponencial), os resultados para ambas as estirpes revelaram um aumento de expressão dos genes lpp0972, lpp1340 e lpp1900. Na estirpe ST1 ocorreu ainda uma diminuição da expressão do gene lpp0094. Na estirpe ST100, os genes lpp1315 e lpp1612b apresentaram igualmente um aumento de expressão nesta fase. Os valores encontrados variaram entre um aumento de  $161 \pm 58x$  (lpp972 – ST100) e  $3,7 \pm 1,3x$  (lpp1612b – ST100), (Figura 42, Anexo XII).

Estudando a expressão da estirpe ST1 após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac, verificou-se que dos onze genes avaliados, todos apresentaram alteração na sua expressão, à exceção de dois (lpp1170, lpp1900). Destes, sete genes apresentaram um aumento de expressão e dois, uma diminuição. Os valores obtidos, para os genes cuja expressão aumentou, variaram entre  $227 \pm 83x$  (lpp2607) e  $5,5 \pm 2,4x$  (lpp1315) comparativamente à expressão génica da bactéria que foi inoculada nas amibas (neste ensaio, a amostra calibradora foi a suspensão utilizada no respetivo ensaio de co-cultura Lp-Ac, isto é, a *L. pneumophila* que foi recolhida de uma cultura líquida na fase estacionária). Dos genes que diminuíram, o lpp0972 variou  $4,1 \pm 1,4x$  e o lpp1340 variou  $2,5 \pm 0,9x$ . A estirpe ST100 apresentou um comportamento diferente, uma vez que só os genes lpp0875, lpp972 e lpp1340 apresentaram alterações superiores a 2x, o primeiro aumentando e os outros dois diminuindo a sua expressão *versus* a respetiva amostra calibradora (Figura 43, Anexo XII).

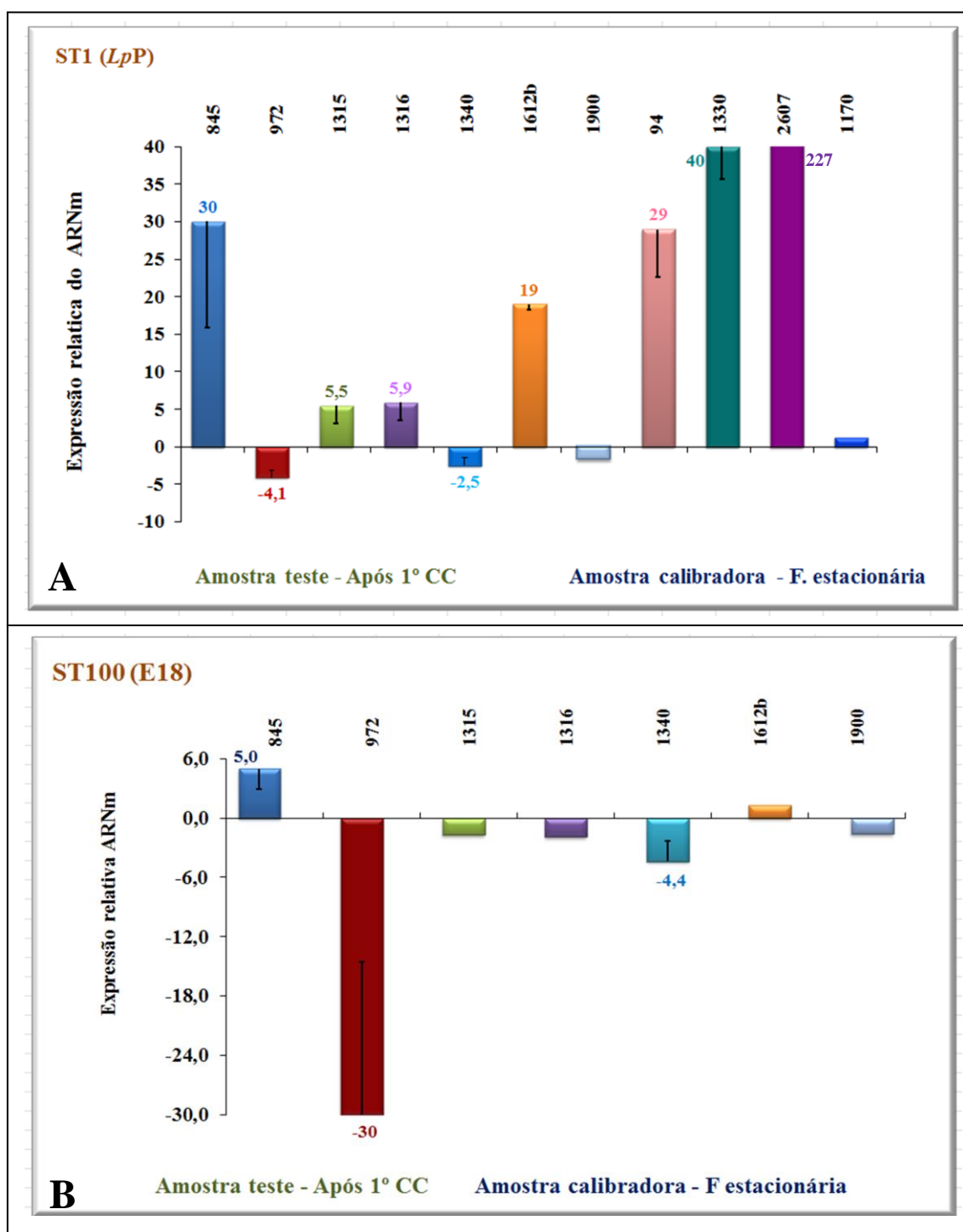
Os resultados obtidos após o 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac, comparativamente ao 1º ciclo (amostra calibradora), mostram que na estirpe ST1 só os genes lpp0845, lpp0972 e lpp1612b alteraram a sua expressão, mas só o lpp0972 teve uma significativa alteração, diminuindo  $4 \pm 1,8x$ . Na estirpe ST100, foi o gene lpp0845 a apresentar uma ligeira alteração de expressão, diminuindo  $2,7 \pm 1,0x$  (Figura 44, Anexo XII).



**Figura 42** – Valores da expressão génica da *L.pneumophila* na fase estacionária de uma cultura líquida (a amostra calibradora foi a bactéria recolhida na fase exponencial de uma cultura líquida).

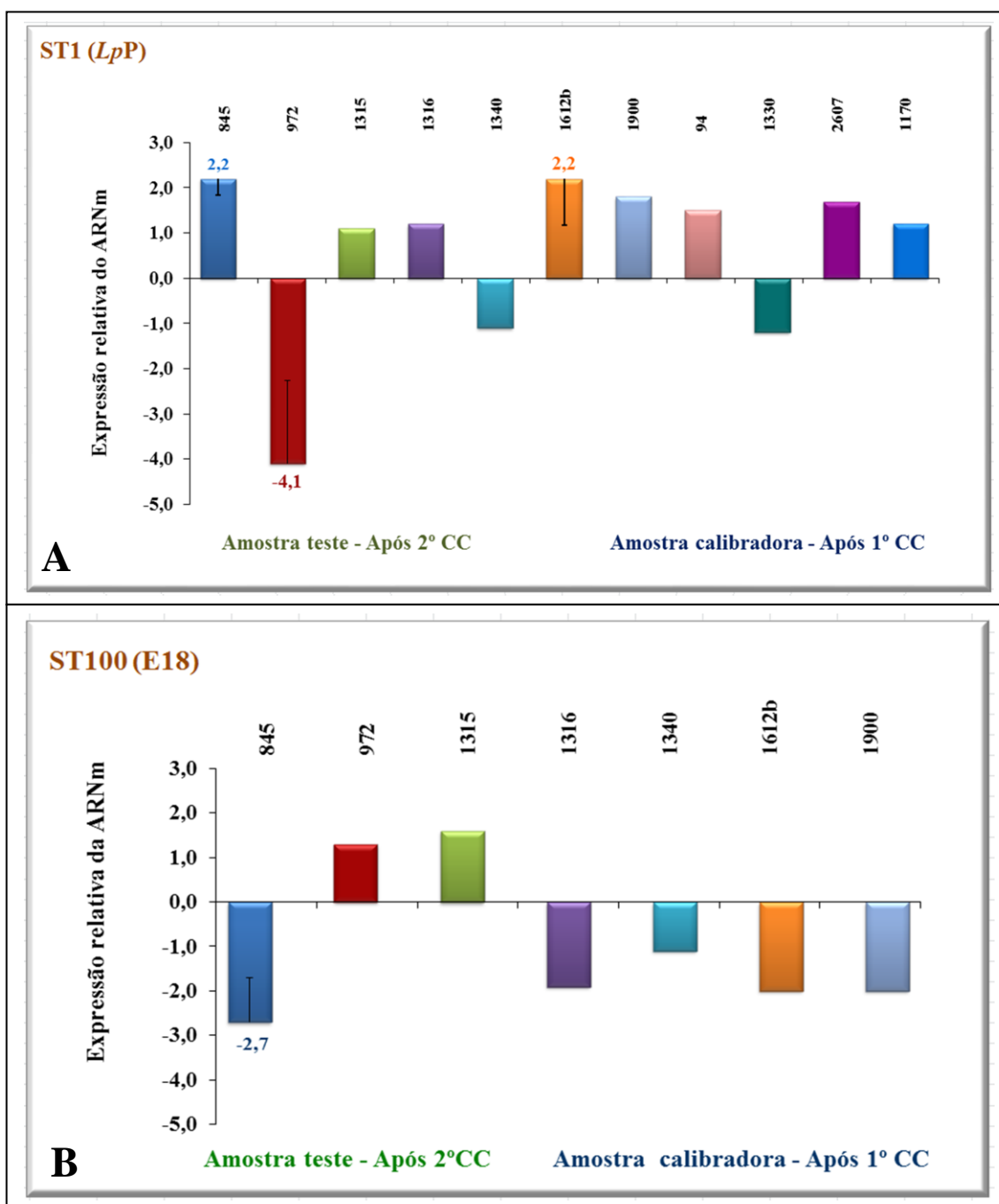
**A** – Resultados da estirpe ST1; **B** – Resultados da estirpe ST100. Só foram representados os valores e os desvios padrões dos genes com expressão superior a 2, os restantes valores encontram-se no anexo XII.





**Figura 43** - Valores da expressão génica da *L. pneumophila* após o 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac (a amostra calibradora foi a bactéria utilizada para a inoculação nas amibas, isto é, recolhida na fase estacionária de uma cultura líquida).

**A** – Resultados obtidos com a estirpe ST1; **B** – Resultados obtidos com a estirpe ST100. Só foram representados os valores e os desvios padrões dos genes com expressão superior a 2, os restantes valores encontram-se no anexo XII.



**Figura 44** - Valores da expressão génica da *L.pneumophila* após o 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac (a amostra calibradora foi a bactéria obtida após utilizada para a inoculação nas amibas, isto é, proveniente do 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac).

**A** – Valores obtidos com a estirpe ST1; **B** – Valores obtidos com a estirpe ST100. Só foram representados os valores e os desvios padrões dos genes com expressão superior a 2, os restantes valores encontram-se no anexo XII.

### 3.2.7.10 Comparação dos resultados dos *microarray* e do PCR em tempo real

Os resultados da expressão génica da estirpe ST1 após o 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac por PCR-TR confirmaram os resultados obtidos por *microarrays*, com exceção dos genes *lpp1170* e *lpp1900*. Por *microarrays* os dois genes tinham apresentado uma diminuição da expressão, utilizando o PCR-TR, no primeiro gene não se verificou qualquer variação, enquanto no segundo a alteração teve sentido contrário (Tabela 25).

**Tabela 25** – Comparação dos resultados da expressão génica de duas estirpes de *L. pneumophila* (ST1 e ST100) após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac utilizando *microarrays* e PCR-TR. Os valores foram obtidos de uma réplica (*microarrays*) e dos duplicados de três réplicas independentes (PCR-TR). Para ambas as metodologias a amostra calibradora foi a *L. pneumophila* da suspensão com que se inoculou a *A. castellanii* nos respetivos ciclos de co-cultura Lp-Ac.

Genes	Proteínas	Resultados <i>Microarrays</i>	Resultados PCR-TR	
			ST1	ST100
<b><i>lpp0845</i></b>	CsrA	+4,5	+30	+5,0
<b><i>lpp0972</i></b>	similar EnhA	-4,0	-4,1	-30
<b><i>lpp1315</i></b>	LspH	+3,2	+5,5	<sup>a</sup>
<b><i>lpp1316</i></b>	LspG	+10,7	+5,9	<sup>a</sup>
<b><i>lpp1340</i></b>	Proteína hipotética	-5,3	-2,5	-4,4
<b><i>lpp1612b</i></b>	SidB	+5,3	+19	<sup>a</sup>
<b><i>lpp1900</i></b>	Proteína hipotética	-4,8	+5,0	<sup>a</sup>
<b><i>lpp0094</i></b>	Proteína hipotética	+6,2	+29	-
<b><i>lpp1170</i></b>	Proteína (GGDEF e EAL)	-3,6	<sup>a</sup>	-
<b><i>lpp1330</i></b>	Proteína hipotética	+6,8	+40	-
<b><i>lpp2607</i></b>	Proteína hipotética	+6,5	+227	-

<sup>a</sup> Sem variação significativa (>2 ou <-2) comparativamente à expressão na amostra calibradora

### 3.3 Discussão

O ciclo de vida da *Legionella* e a sua interação com os protozoários tem sido alvo de estudos por várias equipas de investigação. No presente trabalho realizaram-se ciclos de co-cultura em *A. castellanii* com três estirpes de *L. pneumophila* geneticamente diferentes, uma ST1 (isolado LpP), perfil amplamente disseminado pelo mundo, e outros dois perfis que até ao momento só foram identificados em Portugal, o ST100 (isolado E18), perfil associado a pequenos surtos e a sucessivos casos esporádicos de infeções hospitalares (HospA), e o ST1905 (isolado E96), perfil associado com um dos maiores surtos da comunidade a nível mundial (Vila Franca de Xira, 2014).

Os ciclos de co-cultura Lp-Ac foram efetuados com um MOI de 10, sendo que na literatura estão referenciados MOIs que variam de 0,1 a 100. Segundo Moffat e Tompkins, o MOI não tem efeito sobre a taxa de multiplicação, influenciando, no entanto, o número de bactérias no final do ciclo, dado que quanto mais baixo é o inóculo menos bactérias são fagocitadas pela ameba (209). Da nossa experiência, um MOI muito elevado (>100) não aumenta proporcionalmente a taxa de internalização, sugerindo que existe um limite para o número de bactérias que a ameba consegue fagocitar (dados não apresentados). Os ciclos foram realizados segundo o protocolo utilizado na UBBi, isto é, sem utilizar gentamicina para eliminar as bactérias não fagocitadas após o tempo de contato ameba-bactéria. No nosso protocolo, arrastaram-se estas bactérias com três lavagens sucessivas com meio MMCC (24, 120). Os ciclos foram realizados em meio pobre em nutrientes (MMCC) para potenciar a internalização da *L. pneumophila*, que decorreu durante 1h.

O processo de multiplicação intracelular foi monitorizado com observações sucessivas ao microscópio invertido e permitiu, em função das alterações morfológicas visualizadas, definir os pontos de recolha para avaliação das taxas de multiplicação. Assim, a perda de aderência e a alteração da morfologia da *A. castellanii* da forma amebóide para circular ocorreu ~4h após o início do ciclo de co-cultura Lp-Ac, o início dos turbilhões ~14h e a lise de 90% das amebas às ~22h. Estes tempos são concordantes com observações realizadas por outros grupos. Moffat e Tompkins verificaram que a cinética de replicação de diferentes espécies de *Legionella* em *A. castellanii* apresentava um primeiro período, entre as 2 e as 4h, semelhante à fase de latência de uma cultura líquida a que se seguia uma fase exponencial, entre as 10 e 20h, após a qual se observava uma diminuição no número de amebas viáveis e por isso a multiplicação da *Legionella* diminuía (209). Corroborando estas observações Bruggemann e colaboradores verificaram que três estirpes de *L. pneumophila* (Philadelphia, Lens, Paris) mudavam do fenótipo replicativo (bacilo imóvel) para fenótipo transmissível (bacilo móvel) ~11h após o início do ciclo de co-cultura Lp-Ac. Por outro lado, a avaliação do transcrito das referidas

estirpes mostrou que 14h após o início da co-cultura Lp-Ac, a maioria dos genes associados à fase transmissível têm valores inferiores aos observados na cultura líquida às 11h (24).

O processo de quantificação das UFC/mL às 0, 4 e 14h envolveu a lise das amibas para a libertação das bactérias intracelulares. No presente trabalho recorreu-se a uma ação mecânica combinada: centrifugação a uma velocidade elevada e passagem por agulha, para potenciar o efeito e garantir que todas as bactérias seriam quantificadas. Cada um destes métodos é considerado muito eficiente na libertação das bactérias e ambos possuem a vantagem de não comprometerem a sua viabilidade. O mesmo não se verifica quando se utilizam compostos químicos ou ciclos de congelação/dcongelação para rebentar a membrana da amiba (61).

No presente trabalho, as três estirpes apresentaram ciclos de co-cultura similares, mostrando que as diferenças genéticas que as distinguem não alteram a capacidade para entrar e replicar no interior da *A. castellanii* à temperatura testada (37°C).

Será interessante investigar se a outras temperaturas, como por exemplo a 20°C e 30°C, as estirpes mantêm o mesmo padrão de multiplicação.

Em outros estudos, diferentes estirpes de *L. pneumophila*, Philadelphia1, Bloomington2, Dallas1E, Chicago2 e espécies (*L. micdadei*, *L. hackeliae*, *L. fallonii*) têm revelado diferentes taxas de crescimento quando as temperaturas a que são realizadas as co-culturas variam (120). Nestes estudos foram igualmente assinaladas diferenças nos padrões de crescimento das estirpes quando são utilizadas outras espécies de amibas, sugerindo que a capacidade de replicação é dependente da temperatura e do hospedeiro. Esta área de investigação é importante porque a amplificação da *Legionella* nos ecossistemas artificiais é multifatorial, pelo que, intervenções sobre estes dois parâmetros (disponibilidade do hospedeiro que suporta o crescimento e a temperatura adequada) devem ser ponderadas sempre que se pretendam eliminar focos infecciosos.

Os tempos de duplicação obtidos no presente estudo foram similares aos registados em outros estudos em que a espécie *L. pneumophila* foi utilizada, por exemplo, 56 minutos para a estirpe Philadelphia, (209), 48 minutos para a estirpe Paris, 42 minutos para a Lens e 37 minutos para a Philadelphia (24). As diferenças sugerem que os valores variam não só em função das condições específicas de cada experiência, como da estirpe em estudo.

Nos ciclos de co-cultura, realizados com LpP que se multiplicou no interior da *A. castellanii* (2º ciclo), verificou-se que, comparativamente ao observado no 1º ciclo, foram fagocitadas ~100 vezes mais bactérias mantendo-se, no entanto, sem alteração a taxa de replicação intracelular às 24h. Que seja do nosso conhecimento esta avaliação ainda não tinha sido realizada. Em ambos os ciclos o número de bactérias, entre as 24 e 45h, manteve-se igual ou diminuiu ~10 vezes; o

MMCC não permite a multiplicação bacteriana e pelo contrário, devido à ausência de nutrientes, origina uma progressiva perda de viabilidade das bactérias.

Ao longo de todos os ciclos de co-cultura Lp-Ac observou-se que algumas das amibas que não internalizaram *LpP* durante a hora de contato, fagocitaram bactérias provenientes da multiplicação intracelular. Por esta razão, foi frequente visualizar-se em paralelo amibas a lisar e amibas com turbilhões.

Neste estudo e em concordância com o descrito por outros autores, as bactérias que se multiplicaram intracelularmente apresentaram a forma de bacilos curtos e com elevada mobilidade (138, 244). Estas bactérias, em ensaios de infecção de culturas U937, mostraram-se mais infecciosas que as provenientes de culturas em BCYE- $\alpha$  (dados não apresentados neste estudo por só ter sido efetuado um ensaio com bactérias provenientes de um ciclo de co-cultura em amibas e por se pretenderem realizar as confirmações com a linha TPH1, só recentemente disponível no nosso laboratório). Caso os resultados se venham a confirmar nesta linha celular, será interessante complementar o estudo, por exemplo, utilizando *Caenorhabditis elegans*, nemátodo do solo que tem vindo a ser usado com sucesso como modelo para os estudos de patogenicidade de bactérias, devido à elevada semelhança entre os factores de virulência necessários para a patogénese neste nemátodo e no homem (20).

No presente trabalho, a utilização da citometria teve dois objetivos principais: a diminuição do tempo de quantificação da *L. pneumophila* durante os ciclos de co-cultura Lp-Ac, dado que normalmente a contagem das UFC/ml, como a bactéria tem um crescimento lento, só tem valores ao fim de uma semana e eliminar o viés devido ao elevado manuseamento manual (diluições, inoculação e contagem das UFC), aumentando, desta forma a precisão no cálculo das taxas de internalização e multiplicação intracelular. A citometria permite analisar um elevado número de células de forma automatizada e processar os dados recorrendo a *software* específico. Numa primeira fase, marcou-se *LpP* antes de inocular *A. castellanii* para que nos pontos de avaliação da co-cultura Lp-Ac fosse possível quantificar diretamente as bactérias através da medição da fluorescência. Para tal, testaram-se fluorocromos usualmente utilizados nos ensaios de proliferação, fagocitose ou citotoxicidade (PKH67, CFSE, TO, PI). Para realizar esta avaliação foi necessário definir as zonas ou *gates* específicos para *LpP* vivas, mortas e restos de amibas lisadas, e fazer as compensações necessárias para não haver sobreposição de fluorescências que falseassem os resultados. Assim, prepararam-se e analisaram-se três tipos de amostras: *LpP* vivas, marcadas com um fluorocromo para as células viáveis (PKH67, CFSE, TO) e para células mortas (PI) e uma mistura das duas anteriores marcadas em simultâneo com os dois fluorocromos. A análise baseou-se na dispersão frontal da luz (*forward scatter*) que fornece informação sobre o volume celular e na dispersão lateral da luz (*side scatter*) que mede

a complexidade interna. Esta fase não se revelou uma tarefa fácil dada a heterogeneidade de marcação da *L. pneumophila* e a falta de discriminação entre bactérias vivas e mortas, problema que não se verificou com as outras bactérias testadas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), pelo que, o resultado obtido com a *L. pneumophila* não parece poder ser atribuído ao método aplicado. Uma possível explicação para esta dificuldade em obter uma marcação homogênea poderá estar na composição da membrana da *Legionella* que é diferente das restantes Gram negativas. No LPS da *Legionella* predominam cadeias ramificadas de ácidos gordos e um elevado número de grupos O e N acetil que, conjuntamente com a ausência dos ácidos gordos hidroxilados comuns na região do lípido A confere ao LPS uma grande hidrofobicidade (262). Estas diferenças poderão ter interferido com a marcação não permitindo a definição de *gates* específicos para cada um dos elementos presentes nos poços de co-culturas Lp-Ac.

Por outro lado, a quantificação por citometria não foi concordante com os resultados da inoculação em BCYE- $\alpha$ , para esta discrepância terão contribuído, a dificuldade acima referida (definição pouco precisa dos *gates*) e ter-se utilizado *beads* que estão otimizadas para contagem de leucócitos. Outro fator que influenciou a decisão da não continuação dos ensaios foi o acesso restrito ao único citómetro existente na altura na instituição. O equipamento estava reservado para o diagnóstico e só esporadicamente podia ser utilizado em ensaios de investigação.

Os resultados da sensibilidade ao sódio e ao potássio mostraram-se concordantes com o esperado, na fase exponencial, a bactéria por estar em fase replicativa foi resistente ao sódio e foi osmoticamente sensível, passando a sensível ao sódio e osmoticamente resistente na fase estacionária e após a co-cultura Lp-Ac demonstrando, assim, que à saída da amíba se encontra em fase virulenta. Entre o 1º ciclo e o 2º ciclo de co-cultura não se verificaram diferenças nas percentagens de sensibilidade e resistência ao sódio e ao potássio, respetivamente. Estes valores indiciam, de forma grosseira, que as bactérias estarão numa fase de virulência semelhante no final de ambos os ciclos.

Como já foi referido anteriormente, as bactérias do género *Legionella* apresentam uma elevada heterogeneidade genética, devido à plasticidade do seu genoma, que lhes permite adaptarem-se a diferentes hospedeiros e nichos ambientais (46, 119, 162). A bactéria, que alterna entre o meio intracelular e extracelular, apresenta um ciclo de vida bifásico, com uma fase replicativa e outra transmissível (74, 244), sendo que esta alternância se traduz numa alteração profunda no padrão de expressão génica (24, 160). Os mecanismos moleculares desta diferenciação e das interações bactéria-hospedeiro têm vindo a ser objeto de estudo, em especial, pelo grupo da UBBI do Instituto Pasteur (C. Buchrieser).

A realização de estudos de expressão génica com *Legionella* em cultura líquida ou em co-culturas com *A. castellanii*, permitem deduzir como a bactéria se adapta e interage com este hospedeiro. O presente trabalho insere-se nesta área de estudo, pretendendo-se avaliar quais as alterações génicas que a bactéria apresenta após a saída da amíba.

O desenvolvimento que se verificou nos últimos anos nas tecnologias de sequenciação, que permitiram um aumento exponencial na disponibilidade de sequências de nucleótidos e, paralelamente, nas tecnologias de robótica, facilitou a produção de *microarrays*. Esta metodologia veio substituir o *northern blot* no estudo do padrão de expressão génica, com a enorme vantagem de permitir a análise, em simultâneo, de dezenas de milhares de transcritos, isto é, com esta metodologia é possível avaliar alterações ao nível do genoma global *versus* a avaliação centrada em genes selecionados (174).

Durante o presente trabalho foi possível utilizar esta metodologia, num dos estágios realizados na UBBI, para estudar a expressão génica da *Legionella* após co-cultura Lp-Ac. O *microarray* utilizado foi construído com oligonucleótidos específicos de todos os genes previstos no genoma da estirpe Paris e no seu plasmídeo, ao qual foram ainda adicionados mais 285 e 302 genes específicos das estirpes Philadelphia e Lens, respetivamente (24). Muitos dos oligonucleótidos incluídos no *microarray* correspondem a genes hipotéticos, para estes e até para outros já identificados, a função biológica das proteínas que codificam continua desconhecida ou existe apenas uma previsão para uma possível função (24, 32, 119, 160, 162).

Metodologicamente os *microarrays* são exigentes e entre as várias dificuldades sentidas, a primeira, foi a enorme quantidade de ARNm necessária, o que implicou inocular, em simultâneo, uma grande quantidade de frascos (n=12). Por outro lado, atendendo que a semi-vida do ARNm é curta e que se pretendia evitar a estimulação da expressão de genes associados ao *stress*, foi necessário proceder rapidamente à recolha e congelação a -80°C, das amostras teste e calibradora. Outros pontos com enorme relevância no resultado final e sobre os quais foi tida especial atenção foram: antes de iniciar a síntese do ADNc garantir que não existia ADN genómico a contaminar o extrato de ARN; que a marcação com as cianinas foi equivalente na amostra teste e calibradora; que no processo de hibridação se utilizou quantidades iguais de ambas as amostras; que o processo de lavagem foi corretamente realizado; por fim, controlar a aquisição da fluorescência, confirmando que a leitura nos dois canais era sobreponível.

O resultado obtido na avaliação por *microarrays* mostrou que 11% (352/3236) dos genes presentes sofreu alteração na sua expressão após a co-cultura Lp-Ac relativamente à expressão que a bactéria apresentava no momento da inoculação na amíba, os valores situaram-se entre -11 e +11%. Verificando-se que a maioria dos genes presentes (89%, 2884/3236) não alterou a



sua expressão. Este valor é idêntico ao obtido por Bodet e colaboradores (~10%) (16), maior que os 2,3% obtidos num dos estudos realizados com este mesmo *microarrays* (139) e menor que os apresentados em outros estudos que tiveram ~25% de genes a variar (24, 160, 177). No nosso estudo, 4% dos genes aumentou a sua expressão e 7% diminuiu. Entre os genes que viram a sua expressão aumentada, o maior grupo (36%, 21/58) pertence à categoria funcional associada com a virulência, por exemplo, *IcmJ/dotN*, *IcmL/dotI*, *IcmR*, *IcmW* *LspG*, *LspH*, *SdeA*, *SdeC*, *SidB*, seguindo-se a categoria que engloba os genes com função desconhecida e, por último com 5% (3/58), os genes que asseguram o transporte, um gene da família *Pht* e dois do sistema ABC. Entre os genes que se encontram com expressão diminuída à saída da amíba, a maioria (37%, 29/106) não têm função conhecida e na categoria que engloba os genes associados a outras funções (29%, 31/106) destacam-se os genes associados à regulação, nos quais estão seis proteínas reguladoras com domínios GGDEF e EAL (2, 16, 24, 32, 45, 119, 160, 162, 177, 237, 256).

Para confirmação/validação dos resultados obtidos por *microarrays*, selecionaram-se 17 genes para análise por PCR-TR, processo usualmente utilizado neste tipo de estudos (2, 16, 24, 177, 255). Nos genes selecionados incluiu-se sete genes associados com a virulência da bactéria, uns são substratos do sistema Dot/Icm e outros pertencem ao sistema secretor tipo II, incluiu-se também um gene associado à regulação (proteína com domínio GGDEF e EAL), sendo os restantes, genes cuja função ainda não se conhece.

Nesta fase do estudo foi necessário desenhar e selecionar os *primers*, tendo a escolha recaído em *primers* com 19 a 25 bp e que amplificavam entre 100 e 200 bp. Após a imprescindível validação com análises no *Blast* e no *Gene Runner*, seguiu-se a confirmação com a realização de ensaios de especificidade, utilizando o protocolo otimizado da PCR-TR. Nesta primeira fase, os ensaios foram realizados com ADN da estirpe *LpP* e da *A. castellanii*, verificando-se que dois pares de *primers* (*lpp1177* e *lpp2694*) apresentavam amplificação com os dois ADNs, o que não se tinha verificado na avaliação teórica. Esta ocorrência demonstrou a importância da realização em paralelo destes dois passos para uma adequada validação dos *primers*. No final deste processo foram validados *primers* para 13 genes, dois deles (*gyrA*, *lpp3004*) foram utilizados na normalização dos valores da PCR-TR, por isso designados de genes de referência. Numa segunda fase, antes de iniciar a análise da expressão da estirpe ST100, realizou-se o mesmo procedimento de avaliação dos *primers* com o ADN desta estirpe, verificando-se que em três (*lpp0094*, *lpp1170*, *lpp1330*) dos 11 pares de *primers*, não se obteve amplificação. Como foi demonstrado no capítulo 2, as estirpes ST100 e ST1 são genotipicamente diferentes e filogeneticamente distantes, posicionando-se em ramos distintos na árvore que resultou do estudo de enquadramento filogenético da estirpe ST100 na diversidade genómica da espécie *L. pneumophila* e onde foi incluída *LpP* em representação de um dos maiores *clusters* filogenéticos

da espécie (Anexo V, Zoom da figura 22). Estas diferenças parecem só ter afetado as regiões onde estes três *primers* se ligam não afetando os restantes, pelo que só foi possível comparar a expressão de sete dos genes em estudo.

A observação das curvas de dissociação e a determinação da  $T_m$  para cada par de *primers*, cujos valores variaram entre 76 e 82°C, permitiu validar cada reação de PCR-TR e garantir que o valor de  $C_t$  refletia a amplificação do gene alvo e por isso poderia ser utilizado na determinação da expressão relativa do ARNm. Os resultados do estudo da sensibilidade revelaram que a maioria (10/15) dos *primers* selecionados possuía uma boa sensibilidade, com uma reação positiva até 1UG.

O protocolo otimizado da PCR-TR apresentou uma boa reprodutibilidade intra e inter-ensaio e uma eficiência de 98% quer para os dois genes de referência selecionados (*gyrA* e *lpp3004*) quer para os restantes que foram testados, pelo que desta forma garantiu-se que o produto gerado aumentou exponencialmente, dobrando em cada ciclo, permitindo a utilização da fórmula do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  no cálculo da expressão relativa. Este método de cálculo tem sido usado em estudos sobre o transcrito da *Legionella* (2, 16, 24, 139, 177, 255,) e em outras avaliações da expressão relativa do ARNm (295). No presente estudo na escolha dos genes de referência utilizou-se os resultados do *microarrays*, em estudos anteriores a *gyrA* já tinha sido usada uma vez (24); no entanto, outros genes têm sido selecionados, como por exemplo, o gene *csrA* (2) e o 16S ARNr (16, 177). Em nenhum destes estudos foi utilizado mais de um gene de referência, mas diretrizes sobre a publicação de resultados quantitativos de expressão génica por PCR recomendam a utilização de no mínimo dois genes para a normalização dos resultados (34, 167).

No decurso dos diferentes protocolos prévios para a realização da PCR-TR teve-se em atenção os cuidados gerais recomendados quando se trabalha com ARN: limpeza da área de trabalho, utilizou-se a RNaseZap (Ambion); utilização de luvas, pipetas dedicadas só ao manuseamento do ARN, pontas com filtro; trabalhou-se com os tubos dentro de gelo; utilizou-se áreas diferentes para a extração, a preparação da mistura de amplificação e a visualização de géis de agarose. Como se trabalhou com um termociclador da *Applied Biosystems* optou-se por utilizar um SYBR Green com ROX, composto que funciona como uma referência passiva para normalizar a fluorescência em cada poço da PCR-TR.

Na continuação desta fase do trabalho, a extração do ARNm foi um ponto crítico, dada a necessidade de realizar a avaliação dos 15 genes em paralelo, por forma a evitar a introdução de vieses devidos a diferenças nas eficiências em séries distintas de extração, transcrição e PCR-TR. Assim, foram testados alguns *kits* e protocolos de extração (dados não apresentados) tendo o método com o trizol o que apresentou melhor rendimento. Para além dos cuidados acima

descritos, na programação dos ensaios de PCR-TR, analisou-se sempre na mesma sessão as amostras para o mesmo gene.

Um outro ponto que se teve atenção na realização dos ciclos de co-cultura Lp-Ac para o estudo da expressão génica foi a utilização de uma cultura líquida, em vez, de uma cultura em placa, para garantir que todas as bactérias tiveram acesso de forma igual aos nutrientes e por isso se encontravam em igual fase do seu ciclo de vida.

Os resultados da expressão génica na fase estacionária mostram que dos cinco genes associados à virulência, *csrA* (lpp0845), *enhA* (lpp0972), *lspH* (lpp1315), *lspG* (lpp1316), *sidB* (lpp1612b), só o que codifica para uma proteína similar à *EnhA* e que pertence ao grupo dos genes que regulam o gene *fliA*, aumentou a sua expressão nas duas estirpes, este aumento foi igualmente reportado para a estirpe Paris por uma equipa da UBBi (24). Dos outros genes, o *crsA* (lpp0845) conhecido como o regulador do armazenamento do carbono e que tem um importante papel na adaptação da bactéria ao hospedeiro, interferindo em diversas funções dentro da *Legionella* (256), e o *lspG*, do sistema secretor tipo II (lpp1316), não alteram a sua expressão. Quanto aos outros dois genes, *lspH* (lpp1315) e *sidB* (lpp1612b), na *LpP* não variaram e na ST100 aumentaram a sua expressão comparativamente à fase exponencial. Nos dois genes com função desconhecida (lpp1340, lpp1900) o comportamento foi idêntico nas duas estirpes. Estes resultados mostraram uma heterogeneidade de resposta em função da estirpe: dos sete genes analisados em paralelo, cinco variaram na estirpe ST100 e só três apresentaram alteração na ST1. Estas diferenças entre as duas estirpes inverteram-se após o 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac, verificando-se que na estirpe ST100 só três genes alteram a sua expressão enquanto na *LpP* são seis os genes que variam. Num estudo que analisou três estirpes de *L. pneumophila* em co-cultura Lp-Ac, os autores verificaram que apesar da elevada correlação dos transcritomas, alguns genes eram diferencialmente expressos, indicando que cada estirpe requer genes específicos para a sua multiplicação intracelular; entre eles encontravam-se os reguladores GGDEF/EAL, genes envolvidos na transdução e regulação transcricional (24, 160).

Para *LpP* as alterações após o 1º ciclo foram mais marcadas que no 2º ciclo, isto é, dos 11 genes testados no 1º ciclo, 10 variaram a sua expressão *versus* 3 genes no 2º ciclo. A amplitude da variação também foi maior no 1º ciclo situando-se, nos genes que aumentaram a sua expressão, entre  $5,9 \pm 2,35x$  e  $227 \pm 83x$ , por oposição ao valor de  $2,2 \pm 0,35x$  no 2º ciclo.

A estirpe ST100, no 1º ciclo, apresentou variação em três genes e no 2º ciclo só o *csrA* (lpp0845) variou, diminuindo a sua expressão, alteração contrária à verificada no 1º ciclo.

Avaliando o padrão das duas estirpes, após o 1º ciclo e por comparação com a fase estacionária, verifica-se que é inverso. Na *LpP*, dos três genes que aumentaram a sua expressão na fase estacionária, *enhA* (lpp0972), lpp1340 e lpp1900, dois diminuíram a sua expressão após o 1º

ciclo, mas o que inicialmente tinha expressão diminuída (lpp0094) aumentou após a co-cultura Lp-Ac. Destes genes, só o primeiro tem função conhecida e associada com a virulência. Na estirpe ST100, dos cinco genes com expressão aumentada, enhA (lpp0972), lspH (lpp1315), lpp1340, sidB (lpp1312b), lpp1900, dois diminuíram, o enhA (lpp0972) e lpp1340, nos outros não houve alteração de expressão relativamente à amostra calibradora. Isto pode significar que embora as estirpes apresentem o fenótipo correspondente à transmissível (bacilos curtos, móveis, sensíveis ao sódio e resistentes ao choque com o potássio), já estão a preparar a nova fase replicativa, apresentando por isso uma expressão diferente da evidenciada na fase estacionária da cultura líquida. Esta situação já foi referenciada para proteínas com domínios GGDEF/EAL, como a Ralf, que está associada com a evasão ao normal circuito no hospedeiro para evitar a destruição da bactéria, e para substratos do sistema Dot/Icm (24, 160).

Na literatura, os estudos de transcrito foram maioritariamente realizados pela equipa da UBBi, Pasteur, Paris (2, 16, 24, 139, 255) e só um foi realizado por outra equipa (177). As áreas de estudo têm sido distintas: influência do ferro na formação de biofilmes (139), resposta a diferentes meios de crescimento (177) ou estudo de grupos específicos de genes, como os que regulam a síntese do flagelo (2) ou os mecanismos controlados pelo gene *csrA* (256). Só o estudo realizado por Bruggemann e colaboradores foi semelhante ao realizado pela nossa equipa; no entanto, esse estudo avaliou as estirpes Lens, Paris (*LpP*) e Philadelphia às 8, 11 e 14h de co-cultura Lp-Ac, enquanto no presente trabalho testaram-se as estirpes de *LpP* e ST100, 22h após co-cultura Lp-Ac. Os resultados aqui apresentados evidenciam que as estirpes às 22h possuem um transcrito diferente do que foi descrito por essa equipa às 14h de co-cultura (24). No nosso estudo, as bactérias já apresentam flagelo, evidenciado pela sua elevada mobilidade no poço da co-cultura e por isso nos *microarrays* a expressão do gene *flaA* está reprimida, -11x, e inversamente a expressão de outros genes associados ao grupo funcional da virulência, *csrA*, *lspG*, *lspG*, *sidB*, está aumentada, estes últimos valores confirmados por PCR-TR. Durante este estudo verificou-se que três genes com função desconhecida, lpp0094, 1991330 e lpp2607, apresentam um substancial aumento de expressão às 22h de co-cultura, comparativamente à fase estacionária. Caracterizar e investigar estes genes, com avaliação da sua expressão ao longo do ciclo de co-cultura Lp-Ac poderá ajudar na identificação do seu papel no ciclo de vida da *Legionella*.

O presente estudo parece assim ter contribuído para o conhecimento da interação *Legionella-Acanthamoeba*, avaliando como a bactéria se multiplica no interior e regula a sua expressão após a saída deste hospedeiro.

## Capítulo 4 – Conclusões gerais

A análise dos resultados descritos nesta tese permitem em nossa opinião, retirar algumas ilações relativas à epidemiologia da Doença dos Legionários em Portugal e à multiplicação intracelular da *L. pneumophila* na *A. castellanii*.

No que se refere à epidemiologia da DL em Portugal, foi possível determinar a estrutura da população de *Legionella* responsável por casos graves de doença, identificando a diversidade fenotípica e genotípica dos isolados recolhidos entre 1987 e 2016.

No presente estudo, todos os isolados pertencem à espécie *L. pneumophila* e maioritariamente (97%) ao sg1, tendo sido identificados mais quatro serogrupos (sg8, sg10, sg12, sg14), apenas com percentagens residuais.

Fenotipicamente só um dos isolados clínicos não possui o epítipo associado à virulência, MAb3/1, o que, por um lado, está de acordo com a sua origem, provenientes de quadros graves de doença que tiveram que recorrer ao hospital.

Genotipicamente aplicando o SBT, método atualmente preconizado pelo EWGLI, o índice de diversidade foi de 96%, verificando-se um elevado número de STs (46%) associados a um único isolado e 10% a mais de 10 isolados. Entre os STs detetados, 41% nunca tinham sido identificados em outros países. Dos cinco STs mais disseminados pelo mundo (ST1, ST23, ST37, ST47, ST62), só quatro estão presentes no nosso país, a exceção é o ST47, sendo que no total estes STs foram associados a 10% dos nossos isolados. Estes factos mostram que a população de *L. pneumophila* que circula e provoca doença em Portugal é composta por uma mistura de estirpes, umas que até agora apenas foram isoladas no nosso país e outras que se encontram disseminadas pelo mundo.

No que se refere ao estudo que efetuámos dos isolados obtidos em contexto de surto no HospA, o grau de discriminação alcançado pelas quatro metodologias aplicadas (MAbs, SBT, AFLP, WGS) *versus* o custo inerente a cada uma delas, permite-nos afirmar que a WGS, com um custo de ~100€/amostra, pouco diferente do SBT, e pelo elevado poder discriminante que consegue atingir, será num futuro que se adivinha muito próximo, o novo *gold standard* para a tipificação. A WGS foi aplicada ao estudo de 48 isolados ST100, recuperados ao longo de 26 anos de casos esporádicos e de pequenos surtos (isolados clínicos) e do SDAH do HospA (isolados ambientais). Este perfil é um dos que até ao momento só foi descrito no nosso país e, que seja do nosso conhecimento, esta é a primeira vez que a WGS é aplicada a um tão grande número de isolados, abrangendo um período tão alargado de tempo.

Os resultados permitiram agrupar os isolados num único clone, que é divergente das estirpes anteriormente associadas a grandes surtos, Philadelphia-1, Paris, Lens, Corby e 2300/99 Alcoy. Da análise do genoma foi ainda possível concluir que a estirpe partilhava uma região associada à biossíntese do LPS com outra estirpe que também só foi identificada em Portugal, estirpe Pt\_VFX/2014 (ST1905) responsável por um dos maiores surtos ocorridos até ao momento em todo o mundo, o de Vila Franca de Xira, em 2014. O elevado potencial de discriminação desta metodologia permitiu aceder à microevolução da estirpe epidémica, diferenciando três sub-linhagens com alguma concordância no que respeita à cronologia da data de isolamento, e confirmou também o SDAH como responsável pela disseminação da *Legionella* no HospA.

Os resultados da aplicação da tipificação diretamente em amostras clínicas, um outro ponto abordado neste trabalho, permitiram concluir que, dependendo do número de *Legionella* presente, é possível determinar o perfil alélico da bactéria com segurança, e assim efetuar inferências epidemiológicas sem ter de esperar pelo crescimento da bactéria em meio de cultura. No estudo das relações evolutivas dos perfis identificados em Portugal verificou-se que os 39 STs apresentam uma baixa relação entre si, existindo um elevado número (69%) de *singletons*. Quanto à integração destes STs na epidemiologia geral da *L. pneumophila* concluiu-se que dos 39 só seis não estabeleceram qualquer relação com outro ST da Base de dados do Grupo Europeu, entre estes está o ST100 que até ao momento só foi isolado no HospA e mais quatro dos 16 novos STs. Dos restantes STs, todos mostram relação com dois ou mais STs existentes na BD-EWGLI/SBT, incluindo 11 dos novos STs verificando-se, ainda, que nove dos STs identificados em Portugal foram definidos como fundadores de CCs que englobam vários STs.

A segunda parte desta tese foi dedicada ao estudo da interação *Legionella* - *Acantamoeba*. Utilizou-se uma estirpe de *Legionella* com disseminação mundial, LpP, e duas que só foram identificadas no nosso país, ST100 e Pt\_VFX/2014 (ST1905), e que tinham sido responsáveis por um elevado número de casos de DL. Nos ensaios realizados foi possível concluir que as três estirpes investigadas, apesar de genotipicamente diferentes têm, nas condições testadas, ciclos de desenvolvimento similares. Quando se submeteu uma das estirpes a um 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac concluiu-se que a taxa de internalização foi superior à verificada no 1º ciclo. Que seja do nosso crescimento esta é uma avaliação que nunca tinha sido efetuada. No entanto, esta diferença não foi acompanhada de alterações na taxa de multiplicação ou num aumento da sensibilidade ao sódio ou resistência ao potássio.

Na avaliação do transcrito, realizada por duas metodologias, concluiu-se que 11% dos genes avaliados nos *microarrays* variaram no final do 1º ciclo, comparativamente à fase estacionária. Entre os 4% que viram a sua expressão aumentada, a maioria pertence à categoria funcional associada com a virulência, enquanto entre os 7% que diminuíram de expressão, a maioria não tem função conhecida. A análise por PCR-TR dos 11 genes selecionados confirmou os

resultados dos *microarrays* e a existência, no final do ciclo de co-cultura, de um padrão de expressão diferente do evidenciado na fase estacionária. Concluiu-se, desta forma, que às 22h da co-cultura, numa altura em que a bactéria já saiu da amiba, a expressão é compatível com a preparação para a próxima fase replicativa. Embora na área de estudo das interações entre a *Legionella* e a amiba já tenham sido efetuadas algumas avaliações, é a primeira vez que se analisa a *Legionella* nesta fase.

Comparando os perfis de expressão das duas estirpes de *L. pneumophila* no final do 1º e 2º ciclos de co-cultura, os dados sugerem que cada uma das estirpes ativa genes específicos para a sua multiplicação intracelular.

No seguimento deste trabalho será interessante alargar o estudo do transcritoma a outras estirpes de *Legionella* com o objetivo de alargar as conclusões do presente trabalho. Dado que na investigação epidemiológica da Doença dos Legionários em Portugal foram identificados vários novos STs, parece-nos pertinente que a escolha recaia sobre estes, muito em particular sobre a estirpe ST1905, associada ao surto de Vila Franca de Xira.

Seria ainda importante aumentar o número de genes estudados pela técnica de PCR-TR. Pensamos que a seleção deverá incidir sobre genes do grupo funcional da regulação, por terem um papel essencial no funcionamento global do ciclo de vida da bactéria e também porque no único gene que foi avaliado por PCR-TR o resultado não confirmou o obtido com *microarrays*. A avaliação de outros genes com função desconhecida é também uma área que nos parece pertinente, dado que poderá proporcionar informações relevantes sobre o seu papel na interação *Legionella*-hospedeiro e portanto, na virulência. A realização de ensaios de co-cultura Lp-Ac com mutantes para os genes, lpp0094, lpp1330, lpp2607, que pertencem ao grupo acima referido e que, após co-cultura, apresentaram maior variação, poderá fornecer informações sobre a sua função e aumentar o conhecimento atual sobre as estratégias que a bactéria utiliza para se multiplicar e sobreviver no interior dos hospedeiros (natural e homem).





## **Bibliografia**



# Bibliografia

- 1) **Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C.** *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(4):432-48.
- 2) **Albert-Weissenberger C, Sahr T, Sismeiro O, Hacker J, Heuner K, Buchrieser C.** Control of Flagellar Gene Regulation in *Legionella pneumophila* and Its Relation to Growth Phase *J Bacteriol.* 2010; 192(2): 446–455. Published online 2009 Nov 13. doi: 10.1128/JB.00610-09.
- 3) **Al-Quadan T, Price CT, Abu Kwaik Y.** Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* 2012; 20(6): 299-306. doi: 10.1016/j.tim.2012.03.005.
- 4) **Amemura-Mackawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H; Working Group for Legionella in Japan.** Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 6):653-9. doi: 10.1099/jmm.0.017509-0.
- 5) **Amemura-Mackawa J1, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for Legionella in Japan.** Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(12):4263-70. doi: 10.1128/AEM.06869-11.
- 6) **Annaka T.** Rapid and simple detection of *Legionella* species by LAMP, a new DNA amplification method. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi.* 2003;14(1):25-30.
- 7) **Avni T, Bieber A, Green H, Steinmetz T, Leibovici L, Paul M.** Diagnostic Accuracy of PCR Alone and Compared to Urinary Antigen Testing for Detection of *Legionella* spp.: a Systematic Review. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(2):401-11. doi: 10.1128/JCM.02675-15.
- 8) **Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P.** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(8): 2420-5.
- 9) **Barker J, Brown MR.** Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology.* 1994; 140 (Pt 6): 1253-9.
- 10) **Barker J, Scaife H, Brown MR.** Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(12):2684-8.
- 11) **Bartley PB, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Muguli R, Prado L, Garnys V, Taylor K, Barnett TC, Pinna G, Robson J, Paterson DL, Walker MJ, Schembri MA, Beatson SA.** Hospital-wide Eradication of a Nosocomial *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Outbreak. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(3):273-9. doi: 10.1093/cid/civ870.
- 12) **Baptista-Fernandes T, Dias A, Nascimento M, Dias J, Chasqueira MJ, Rodrigues L, Leite R, Bento D, Mansinho K, Marques T.** Evaluation of the prevalence of *Legionella* spp in two populations of patients with pneumonia, with and without HIV infection, and optimization of laboratory diagnosis by co-culture in *acanthamoeba castellanii*. Preliminary report. Presented in the 25<sup>th</sup> meeting 2010, Copenhagen, Denmark.
- 13) **Beauté J, Zucs P, de Jong B, on behalf of the European Legionnaires' Disease Surveillance Network.** Legionnaires' disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill.* 2013; 18(10): pii=20417.  
Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20417>

- 14) **Begum YA, Baby NI, Faruque AS, Jahan N, Cravioto A, Svennerholm AM, Qadri F.** Shift in phenotypic characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from diarrheal patients in Bangladesh. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(7):e3031. doi: 10.1371/journal.pntd.0003031.
- 15) **Berk SG, Faulkner G, Garduño E, Joy MC, Ortiz-Jimenez MA, Garduño RA.** Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. does not require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-mediated survival mechanism. Appl Environ Microbiol. 2008 Apr;74(7):2187-99. doi: 10.1128/AEM.01214-07.
- 16) **Bodet C, Sahr T, Dupuy M, Buchrieser C, Héchard Y.** *Legionella pneumophila* transcriptional response to chlorine treatment. Water Res. 2012; 46(3):808-16. doi: 10.1016/j.watres.2011.11.059.
- 17) **Borges V, Nunes A, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, Gonçalves P, Gomes JP.** *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. Sci Rep. 2016; 6:26261. doi: 10.1038/srep26261.
- 18) **Bosch T, Euser SM, Landman F, Bruin JP, IJzerman EP, den Boer JW, Schouls LM** Whole-Genome Mapping as a Novel High-Resolution Typing Tool for *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2015; 53(10): 3234-8. doi: 10.1128/JCM.01369-15.
- 19) **Bouyer S, Imbert C, Rodier MH, Héchard Y.** Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. Environ Microbiol. 2007; 9(5): 1341-4.
- 20) **Brassinga AK, Sifri CD.** The Caenorhabditis elegans model of *Legionella* infection. Methods Mol Biol. 2013; 954: 439-61. doi: 10.1007/978-1-62703-161-5\_27.
- 21) **Brenner DJ; Steigerwalt AG; McDade JE.** Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. Ann.Intern. Med. 1979; 90: 656-658.
- 22) **Brenner DJ, Steigerwalt A, Gorman W, Weaver RE, Feeley JC, Cordes LG, Wilkinson HW, Patton C, Thomason BM, Sassevill VILL KRL.** *Legionella bozemanii* sp. nov. and *Legionella dumoffii* sp. nov.: Classification of two additional species of *Legionella* associated with human pneumonia. Curr. Microbiol. 1980; 4: 111-116.
- 23) **Brenner DJ, Steigerwalt AG, Epple P, Bibb WF, McKinney RM, Starnes RW, Colville JM, Selander RK, Edelstein PH, Moss CW.** *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. J Clin Microbiol. 1988; 26(9): 1695-703.
- 24) **Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C.** Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(1):86-94.
- 25) **Burdet C, Lepeule R, Duval X, Caseris M, Rioux C, Lucet JC, Yazdanpanah Y.** Quinolones versus macrolides in the treatment of legionellosis: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2014 S;69(9):2354-60. doi: 10.1093/jac/dku159
- 26) **Byrne B, Swanson MS.** Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infect Immun. 1998;66(7):3029-34.
- 27) **Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D.** Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. Epidemiol Infect. 2013; 141(12):2644-9. doi: 10.1017/S0950268813000502.
- 28) **Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S.** Legionnaires' disease in France. Med Mal Infect. 2015; 45(3):65-71. doi: 10.1016/j.medmal.2015.01.015.

- 29) **Carratalà J, Garcia-Vidal C.** An update on *Legionella*. Curr Opin Infect Dis. 2010; 23(2):152-7. doi: 10.1097/QCO.0b013e328336835b.
- 30) **Casini B, Valentini P, Baggiani A, Torracca F, Lorenzini C, Frateschi S, Matteoli B, Privitera G.** Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. Water Sci Technol. 2008;58(3):683-8. doi: 10.2166/wst.2008.434.
- 31) **Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C.** Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat Genet. 2004; 36(11):1165-73.
- 32) **Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, Buchrieser C.** Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. Genome Res. 2008; 18(3):431-41. doi: 10.1101/gr.7229808.
- 33) **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Legionellosis - United States, 2000–2009. MMWR 2011; 60 (32):1083-1086.
- 34) **Chapman JR, Waldenström J.** With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. PLoS One. 2015; 10(11):e0141853. doi: 10.1371/journal.pone.0141853. eCollection 2015.
- 35) **Chasqueira MJ, Rodrigues L, Nascimento M, Marques T.** Sequence-based and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* isolated from patients in Portugal during 1987-2008. Euro Surveill. 2009; 14(28). pii: 19271.
- 36) **Chasqueira MJ, Rodrigues L, Nascimento M, Ramos M, Marques T.** Genetic diversity and evolutionary relationships among *Legionella pneumophila* clinical isolates, Portugal, 1987 to 2012. Euro Surveill. 2014; 19(46). pii: 20965.
- 37) **Chedid MB, Ilha Dde O, Chedid MF, Dalcin PR, Buzzetti M, Jaconi Saraiva P, Griza D, Menna Barreto SS.** Community-acquired pneumonia by *Legionella pneumophila* serogroups 1-6 in Brazil. Respir Med. 2005; 99(8):966-75.
- 38) **Chen DJ, Procop GW, Vogel S, Yen-Lieberman B, Richter SS.** Utility of PCR, Culture, and Antigen Detection Methods for Diagnosis of Legionellosis. J Clin Microbiol. 2015; 53(11):3474-7. doi: 10.1128/JCM.01808-15.
- 39) **Compain F, Bruneval P, Jarraud S, Perrot S, Aubert S, Napoly V, Ramahefasolo A, Mainardi JL, Podglajen I.** Chronic endocarditis due to *Legionella anisa*: a first case difficult to diagnose. New Microbes New Infect. 2015; 8:113-5. doi: 10.1016/j.nmni.2015.10.003.
- 40) **Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, Gonçalves J, Antunes DM, Almeida S, Mendes A, Guerreiro M, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, Gonçalves P, Gomes JP.** Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. N Engl J Med. 2016, 4; 374(5):497-8. doi: 10.1056/NEJMc1505356.
- 41) **Coscollá M, Fenollar J, Escribano I, González-Candelas F.** Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. Emerg Infect Dis. 2010;16(9):1381-7. doi: 10.3201/eid1609.100248.
- 42) **Costa J, Tiago I, da Costa MS, Veríssimo A.** Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(2):663-71.
- 43) **Costa J, da Costa MS, Veríssimo A.** Colonization of a therapeutic spa with *Legionella* spp: a public health issue. Res Microbiol. 2010a; 161(1):18-25. doi: 10.1016/j.resmic.2009.10.005.
- 44) **Costa J, Tiago I, Da Costa MS, Veríssimo A.** Molecular evolution of *Legionella pneumophila* dotA gene, the contribution of natural environmental strains. Environ Microbiol. 2010b; 12(10):2711-29. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02240.x.

- 45) **Costa J, d'Avó AF, da Costa MS, Veríssimo A.** Molecular evolution of key genes for type II secretion in *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol.* 2012; 14(8):2017-33. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02646.x.
- 46) **Costa J, Teixeira PG, d'Avó AF, Júnior CS, Veríssimo A.** Intragenic recombination has a critical role on the evolution of *Legionella pneumophila* virulence-related effector sidJ. *PLoS One.* 2014; 9(10):e109840. doi: 10.1371/journal.pone.0109840.
- 47) **Cunha BA, Burillo A, Bouza E.** Legionnaires' disease. *Lancet.* 2016; 387(10016):376-85. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60078-2.
- 48) **Currie SL, Beattie TK.** Compost and *Legionella longbeachae*: an emerging infection? *Perspect Public Health.* 2015; 135(6):309-15. doi: 10.1177/1757913915611162.
- 49) **David S, Mentasti M, Tewolde R, Aslett M, Harris SR, Afshar B, Underwood A, Fry NK, Parkhill J, Harrison TG.** Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. *J Clin Microbiol.* 2016a; 54(8):2135-48. doi: 10.1128/JCM.00432-1.
- 50) **David S, Rusniok C, Mentasti M, Gomez-Valero L, Harris SR, Lechat P, Lees J, Ginevra C, Glaser P, Ma L, Bouchier C, Underwood A, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J, Buchrieser C.** Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. *Genome Res.* 2016b. pii: gr.209536.116.
- 51) **David S, Afshar B, Mentasti M, Ginevra C, Podglajen I, Harris SR, Chalker VJ, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J.** *Seeding and Establishment of Legionella pneumophila* in Hospitals: Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease. *Clin Infect Dis.* 2017;64(9):1251-1259. doi: 10.1093/cid/cix153.
- 52) **De Buck E, Anné J, Lammertyn E.** The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology.* 2007; 153(Pt 12):3948-53.
- 53) **Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, Bosman A, Van den Hof S, Van Vliet HA, Peeters MF, Van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-Van Spaendonck MA.** A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(1):37-43. Erratum in: *Emerg Infect Dis* 2002;8(2):180.
- 54) **Den Boer JW, Euser SM, Brandsema P, Reijnen L, Bruin JP.** Results from the National Legionella Outbreak Detection Program, the Netherlands, 2002-2012. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(7):1167-73. doi: 10.3201/eid2107.141130.
- 55) **Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S.** Contribution of amoebic coculture to recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1725-6. doi: 10.1128/JCM.06531-11.
- 56) **Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S.** Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. *J Microbiol Methods.* 2014; 98:119-21. doi: 10.1016/j.mimet.2014.01.001.
- 57) **Diaz MH, Waller JL, Napoliello RA, Islam MS, Wolff BJ, Burken DJ, Holden RL, Srinivasan V, Arvay M, McGee L, Oberste MS, Whitney CG, Schrag SJ, Winchell JM, Saha SK.** Optimization of Multiple Pathogen Detection Using the TaqMan Array Card: Application for a Population-Based Study of Neonatal Infection. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e66183. doi:10.1371/journal.pone.0066183.
- 58) **Diederer BM, Bruin JP, den Boer JW, Peeters MF, Yzerman EP.** Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 9):1255.
- 59) **Diederer BM.** *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect.* 2008; 56(1):1-12.

- 60) **Dieckmann R, Hammerl JA, Hahmann H, Wicke A, Kleta S, Dabrowski PW, Nitsche A, Stämmler M, Al Dahouk S, Lasch P.** Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2016; 187:353-75. doi: 10.1039/c5fd00165j.
- 61) **Dietersdorfer E, Cervero-Aragó S, Sommer R, Kirschner AK, Walochnik J.** Optimized methods for *Legionella pneumophila* release from its *Acanthamoeba* hosts. *BMC Microbiol.* 2016; 16:74. doi: 10.1186/s12866-016-0691-x.
- 62) **Direcção Geral da Saúde (DGS a). Circular normativa n.º 5/DEP de 22/04/2004** (disponível em: <https://www.dgs.pt/doenca-dos.../circular-normativa-n-5dep-de-22042004-pdf.asp>).
- 63) **Direcção Geral da Saúde (DGS b). Circular normativa n.º 6/DT de 22/04/2004** (disponível em: <https://www.dgs.pt/doenca-dos.../circular-normativa-n-6dt-de-22042004-pdf.aspx>).
- 64) **Direcção Geral da Saúde (DGS).** Vigilância em saúde pública: doença dos legionários em Portugal 200-2013. DGS, 2014 (disponível em: <https://www.dgs.pt/doenca-dos-legionarios/vigilancia-epidemiologica/vigilancia-epidemiologica.aspx>).
- 65) **Doleans, A., H. Aurell, M. Reyrolle, G. Lina, J. Freney, F. Vandenesch, J. Etienne, and S. Jarraud.** Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:458–460.
- 66) **Dooling KL, Toews KA, Hicks LA, Garrison LE, Bachaus B, Zansky S, Carpenter LR, Schaffner B, Parker E, Petit S, Thomas A, Thomas S, Mansmann R, Morin C, White B, Langley GE.** Active bacterial core surveillance for Legionellosis-United States, 2011-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015; 64(42):1190-1193. doi: 10.15585/mmwr.mm6442a2.
- 67) **Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006; 110(5):525-41.
- 68) **Dussault AA, Pouliot M.** Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online.* 2006;8:1-10
- 69) **Edelstein, PH; Finegold, SM.** Use of a semiselective medium to culture *Legionella pneumophila* from contaminated lung specimens. *J Clin Microbiol.* 1979; 10(2):141-3
- 70) **Edelstein PH.** Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol.* 1981; 14(3):298-303.
- 71) **Edwards MT, Fry NK, Harrison TG.** Clonal population structure of *L. pneumophila* inferred from allelic profiling. *Microbiology.* 2008; 154(3):852-64. doi: 10.1099/mic.0.2007/012336-0
- 72) **Eisenreich W, Heuner K.** The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* 2016; 590(21):3868-3886. doi: 10.1002/1873-3468.12326.
- 73) **Ensminger AW.** *Legionella pneumophila*, armed to the hilt: justifying the largest arsenal of effectors in the bacterial world. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 29:74-80. doi: 10.1016/j.mib.2015.11.002.
- 74) **Escoll P, Rolando M, Gomez-Valero L, Buchrieser C.** From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 376:1-34. doi: 10.1007/82\_2013\_351.
- 75) **Essig A, von Baum H, Gonser T, Haerter G, Lück C.** Microbiological diagnosis and molecular typing of *Legionella* strains during an outbreak of legionellosis in Southern Germany. *Int J Med Microbiol.* 2016; 306(2):109-14. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.01.001
- 76) **European Union (EU) - Commission Implementing Decision 2012/506/EU of 8 August 2012, amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council.** Disponível na página do ECDC ([http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires\\_disease/surveillance/Pages/EU-case-definition.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires_disease/surveillance/Pages/EU-case-definition.aspx)).

- 77) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Legionnaires disease in Europe, 2010. Stockholm: ECDC; 2012.  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/SUR-Legionnaires-disease-surveillance-2010.pdf>
- 78) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Legionnaires' disease in Europe, 2011. Stockholm: ECDC; 2013.  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-in-europe-2011.pdf>
- 79) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Legionnaires' disease in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2014  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-surveillance-2012.pdf>
- 80) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Legionnaires' disease in Europe, 2013. Stockholm: ECDC; 2015.  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-2015.pdf>
- 81) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Legionnaires' disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC; 2016a.  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf>
- 82) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Increase of cases of Legionnaires' disease in EU travellers returning from Dubai, October–December 2016 – 22 December 2016. Stockholm: ECDC; 2016b  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/20-Dec-2016-RRA-Legionella-United%20Arab%20Emirates.pdf> (visualizado a 29-12-2016)
- 83) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Communicable-disease-threats-report-28-jan-2017. Stockholm: ECDC; 2017a  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/communicable-disease-threats-report-28-jan-2017.pdf> (accedido a 3/2/2017)
- 84) **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Annual epidemiological report for 2015 – Legionnaires' disease. Stockholm: ECDC; 2017b.  
<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Legionnaires/Pages/Annual-epidemiological-report-2017.aspx>
- 85) **Euser SM, Diederer BM, Bakker M, Honing ML, Bruin JP, Brandsema PS, Reijnen L, Den Boer JW.** Legionnaires' disease after a campervan holiday: a case report. *J Travel Med.* 2016 18; 23(1). pii: tav004. doi: 10.1093/jtm/tav004
- 86) **Farhat C, Mentasti M, Jacobs E, Fry NK, Lück C.** The N-acetylneuraminyltransferase gene, neuA, is heterogenous in *Legionella pneumophila* strains but can be used as a marker for epidemiological typing in the consensus sequence-based typing scheme. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(12):4052-8. doi: 10.1128/JCM.00687-11.
- 87) **Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG.** eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data.. *J Bacteriol.* 2004; 186(5):1518-30.
- 88) **Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB.** Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 1979; 10(4):437-41
- 89) **Fields BS, Benson RF, Besser RE.** *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3):506-26.
- 90) **Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH.** Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.* 1981; 41(1):9-16
- 91) **Fontana S, Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, Ricci ML.** Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(5-6):597-602. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.04.004.
- 92) **Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA.** Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics.* 2009; 10:152. doi: 10.1186/1471-2105-10-152.



- 93) **Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA.** PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. BMC Bioinformatics. 2012; 13:87. doi: 10.1186/1471-2105-13-87.
- 94) **Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard, P. S. Brachman.** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. 1977; 297:1189–1197.
- 95) **Fraser, DW; Deubner, DC; Hill, DL; Gilliam, DK.** Nonpneumonic, short-incubation-period Legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser. Science 1979; 205, 690–691.
- 96) **Fraser DW.** Legionellosis: evidence of airborne transmission. Ann N Y Acad Sci 1980; 353:61e6
- 97) **Fraser DW.** The challenges were legion. Lancet Infect Dis. 2005; 5(4):237-41
- 98) **Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM.** The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. J Gen Microbiol. 1991; 137 (5):1215-22.
- 99) **Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsberg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Helbig JH, Lindsay D, Christian Lück P, Pelaz C, Uldum SA, Harrison TG.** A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. Clin Microbiol Infect. 1999; 5(8):462-477
- 100) **Fry NK, Bangsberg JM, Bernander S, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Hasenberger P, Lindsay D, Papoutsis A, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Harrison TG.** Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis . 2000; 19(10):773-80.
- 101) **Fry NK, Bangsberg JM, Bergmans A, Bernander S, Etienne J, Franzin L, Gaia V, Hasenberger P, Baladrón Jiménez B, Jonas D, Lindsay D, Mentula S, Papoutsis A, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Wannet W, Harrison TG.** Designation of the European Working Group on Legionella Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21(10):722-8.
- 102) **Fry NK, Afshar B, Visca P, Jonas D, Duncan J, Nebuloso E, Underwood A, Harrison TG.** Assessment of fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis for epidemiological genotyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1. Clin Microbiol Infect. 2005; 11(9):704-12.
- 103) **Fry N, Afshar B, Wewalka G, Harrison T.** Epidemiological Typing of *Legionella pneumophila* in the Absence of Isolates, p 152-155. In Cianciotto N, Kwaik Y, Edelstein P, Fields B, Geary D, Harrison T, Joseph C, Ratcliff R, Stout J, Swanson M (ed), *Legionella*. ASM Press, Washington, 2006 DC. doi: 10.1128/9781555815660.ch41
- 104) **Fry NK, Savelkoul PH, Visca P.** Amplified fragment-length polymorphism analysis. Methods Mol Biol. 2009; 551:89-104. doi: 10.1007/978-1-60327-999-4\_8.
- 105) **Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R.** Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. J Clin Microbiol. 2003; 41(7):2932-9.
- 106) **Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG.** Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2005; 43(5):2047-52.

- 107) **Gaia V, Casati S, Tonolla M.** Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol.* 2011; 34(1):40-4. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.007.
- 108) **García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, Rodríguez M, Lopez R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Balandrón B, Pelaz C.** Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(8):915-21.
- 109) **Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS.** Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary phase forms. *Infect. Immun.* 2002; 70:6273–6283
- 110) **Garduño RA.** Life Cycle, Growth Cycles and Developmental Cycle of *Legionella pneumophila*. In: Paul Hoffman, Herman Friedman, and Mauro Bendinelli (eds). *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity Springer, New York, 2008: pag. 77-78
- 111) **Garrity G M, Brown A, Vickers AR.** Tatlockia and Fluoribacter: Two New Genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30(4): 609-614.
- 112) **George F, et al.** A large outbreak of Legionnaires' Disease in an industrial town in Portugal. *Rev Port Saúde Pública.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.10.001>
- 113) **Giebel RA, Fredenberg W, Sandrin TR.** Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Res.* 2008; 42(4-5):931-40.
- 114) **Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M.** Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4):981-7. doi: 10.1128/JCM.02071-08.
- 115) **Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW Jr, Kassanoff I.** Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* 1978; 107(2):149-60
- 116) **Goering RV, Köck R, Grundmann H, Werner G, Friedrich AW, on behalf of the ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM).** From Theory to Practice: Molecular Strain Typing for the Clinical and Public Health Setting. *Euro Surveill.* 2013; 18(4):pii=20383.  
Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20383>
- 117) **Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C.** *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(5):727-39. doi: 10.1016/j.meegid.2009.05.004
- 118) **Gomez-Valero L, Rusniok C, Cazalet C, Buchrieser C.** Comparative and functional genomics of *Legionella* identified eukaryotic like proteins as key players in host-pathogen interactions. *Front Microbiol.* 2011; 2:208. doi: 10.3389/fmicb.2011.00208.
- 119) **Gomez-Valero L, Buchrieser C.** Genome dynamics in *Legionella*: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(6). pii: a009993. doi: 10.1101/cshperspect.a009993.
- 120) **Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, Rouy Z, Moore RJ, Chen H, Petty NK, Jarraud S, Etienne J, Steinert M, Heuner K, Gribaldo S, Médigue C, Glöckner G, Hartland EL, Buchrieser C.** Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol.* 2014; 15(11):505.
- 121) **Gosselin F, Duval JF, Simonet J, Ginevra C, Gaboriaud F, Jarraud S, Mathieu L.** Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of *Legionella pneumophila* sg1: An issue to explain infection potential? *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011; 1; 82(2):283-90. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.08.040.

- 122) **Götz HM, Tegnell A, De Jong B, Broholm KA, Kuusi M, Kallings I, Ekdahl K.** A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. *Epidemiol Infect.* 2001; 126(2):241-7.
- 123) **Graham FF, White PS, Harte DJ, Kingham SP.** Changing epidemiological trends of legionellosis in New Zealand, 1979-2009. *Epidemiol Infect.* 2012; 140(8):1481-96. doi: 10.1017/S0950268811000975
- 124) **Graham RM, Doyle CJ, Jennison AV.** Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. *Epidemiol Infect.* 2014; 142(11):2347-51. doi: 10.1017/S0950268814000375
- 125) **Greatorex J, Ellington MJ, Köser CU, Rolfe KJ, Curran MD.** New methods for identifying infectious diseases. *Br Med Bull.* 2014; 112(1): 27-35. doi: 10.1093/bmb/ldu027
- 126) **Greub G, Raoult D.** Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmannella vermiformis*. *Res Microbiol* 2003; 154:619–621.
- 127) **Grundmann H, Hori S, Tanner G.** Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:4190 – 4192.
- 128) **Guerra L, Pereira J, Fernandes J, Vargas J, Carneiro E.** Um caso de doença dos legionários em Portugal, *O Médico* 1981; 99: 581-588
- 129) **Harrison TG, Doshi N, Fry NK, Joseph CA.** Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13: 78–85
- 130) **Haupt TE, Heffernan RT, Kazmierczak JJ, Nehls-Lowe H, Rheineck B, Powell C, Leonhardt KK, Chitnis AS, Davis JP.** An outbreak of Legionnaires disease associated with a decorative water wall fountain in a hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012; 33(2):185-91. doi: 10.1086/663711
- 131) **Hampton LM, Garrison L, Kattan J, Brown E, Kozak-Muiznieks NA, Lucas C, Fields B, Fitzpatrick N, Sapien L, Martin-Escobar T, Waterman S, Hicks LA, Alpuche-Aranda C, Lopez-Gatell H.** Legionnaires' Disease Outbreak at a Resort in Cozumel, Mexico. *Open Forum Infect Dis.* 2016; 3(3):ofw170.
- 132) **Helbig JH, Lück PC, Witzleb W.** Serogroup-specific and serogroup-cross-reactive epitopes of *Legionella pneumophila*. *Zentralbl Bakteriol.* 1994 J; 281(1):16-23.
- 133) **Helbig JH, Lück PC, Knirel YA, Witzleb W, Zähringer U.** Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol Infect.* 1995; 115(1):71-8.
- 134) **Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Lück PC.** Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(11):2841-5.
- 135) **Helbig, J. H., S. Bernander, M. Castellani Pastoris, J. Etienne, V. Gaia, S. Lauwers, D. Lindsay, P. C. Luck, T. Marques, S. Mentula, M. F. Peeters, C. Pelaz, M. Struelens, S. A. Uldum, G. Wewalka, and T. G. Harrison.** Pan-European study on culture-proven legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21: 710–716.
- 136) **Herigstad B, Hamilton M, Heersink J.** How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods.* 2001; 44(2):121-9.
- 137) **Heuner K, Bender-Beck L, Brand BC, Lück PC, Mann KH, Marre R, Ott M, Hacker J.** Cloning and genetic characterization of the *flagellum* subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect Immun.* 1995; 63(7):2499-507
- 138) **Heuner K, Steinert M.** The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int J Med Microbiol.* 2003; 293(2-3):133-43.

- 139) **Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C, Héchard Y.** Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology*. 2008;154(Pt 1):30-41. doi: 10.1099/mic.0.2007/008698-0.
- 140) **Hoffman PS, Pine L, Bell S.** Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl Environ Microbiol*. 1983; 45(3):784-91
- 141) **Hoffmann C, Harrison CF, Hilbi H.** The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell Microbiol*. 2014; 16(1):15-26. doi: 10.1111/cmi.12235.
- 142) **Honigsbaum M.** Legionnaires' disease: revisiting the puzzle of the century. *Lancet*. 2016; 388(10043): 456-7.
- 143) **Hosein IK, Hill DW, Tan TY, Butchart EG, Wilson K, Finlay G, Burge S, Ribeiro CD.** Point-of-care controls for nosocomial legionellosis combined with chlorine dioxide potable water decontamination: a two-year survey at a Welsh teaching hospital. *J Hosp Infect*. 2005; 61(2):100-6.
- 144) **Hunter PR, Gaston MA.** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*. 1988; 26(11):2465-6.
- 145) **Infectious agents surveillance report (IASR).** Legionellosis, January 2008-December 2012. *IASR* 2013; 34 (6): 155-157 (disponível em: <http://www.nih.go.jp/niid/en/index-e/865-iasr/4237-tpc400.html>)
- 146) **Isenman HL, Chambers ST, Pithie AD, MacDonald SL, Hegarty JM, Fenwick JL, Maze MJ, Metcalf SC, Murdoch DR.** Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae*: Clinical features and outcomes of 107 cases from an endemic area. *Respirology*. 2016; 21(7):1292-9. doi: 10.1111/resp.12808.
- 147) **Jamilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F.** *Legionella*, Legionnaires' disease. *Med Sci (Paris)*. 2012; 28(6-7):639-45. doi: 10.1051/medsci/2012286018.
- 148) **Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J.** Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol Biol*. 2013; 954:27-56. doi: 10.1007/978-1-62703-161-5\_2.
- 149) **Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, Genese CA, Nuorti JP, Fields BS, Benson RF, Carter RJ, Edelstein PH, Guerrero IC, Paul SM, Lipman HB, Breiman R.** Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet*. 1996; 347(9000):494-9.
- 150) **Jimenez-Lucho V, Shulman M, Johnson J.** Bordetella bronchiseptica in an AIDS patient cross-reacts with Legionella antisera. *J Clin Microbiol*. 1994 Dec;32(12):3095-6
- 151) **Johler S, Stephan R, Althaus D, Ehling-Schulz M, Grunert T.** High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Syst Appl Microbiol*. 2016; 39(3):189-94. doi: 10.1016/j.syapm.2016.03.003.
- 152) **Johnson WM, Bernard K, Marrie TJ, Tyler SD.** Discriminatory genomic fingerprinting of *Legionella pneumophila* by pulsed-field electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2620-1.
- 153) **Joly JR, Chen YY, Ramsay D.** Serogrouping and subtyping of *Legionella pneumophila* with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol*. 1983; 18: 1040-1046
- 154) **Joly JR, Ramsay D.** Use of monoclonal antibodies in the diagnosis and epidemiologic studies of legionellosis. *Clin Lab Med*. 1985; 5(3):561-74.
- 155) **Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D.** Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1986; 23(4):768-71.
- 156) **Jonas D, Meyer HG, Matthes P, Hartung D, Jahn B, Daschner FD, Jansen B.** Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(6):2284-91.

- 157) **Joseph CA, Watson JM, Harrison TG, Bartlett CL.** Nosocomial Legionnaires' disease in England and Wales, 1980-92. *Epidemiol Infect.* 1994;112(2):329-45
- 158) **Joseph CA; European Working Group for Legionella Infections.** Legionnaires' disease in Europe 2000-2002. *Epidemiol Infect.* 2004; 132(3):417-24.
- 159) **Joseph CA, Ricketts KD.** From development to success: the European surveillance scheme for travel associated Legionnaires' disease. *Eur J Public Health.* 2007; 17(6):652-6.
- 160) **Jules M, Buchrieser C.** *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett.* 2007; 581(15):2829-38.
- 161) **Katsiaflaka A, Pournaras S, Kristo I, Mouchtouri VA, Kyritsi M, Velonakis E, Vatopoulos AC, Hadjichristodoulou C.** Epidemiological Investigation of *Legionella pneumophila* Serogroup 2 to 14 Isolates from Water Samples by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence-Based Typing and Detection of Virulence Traits. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82(20):6102-6108.
- 162) **Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, Jarraud S.** Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infect Genet Evol.* 2016; 43:108–122 <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.033>
- 163) **Kodani M, Yang G, Conklin LM, Travis TC, Whitney CG, Anderson LJ, Schrag SJ, Taylor TH, Beal BW, Breiman RF, Feikin DR, Njenga MK, Mayer LW, Oberste MS, Tondella ML, Winchell JM, Lindstrom AL, Erdman DD, Fields BS.** Application of TaqMan Low-Density Arrays for Simultaneous Detection of Multiple Respiratory Pathogens. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6): 2175–2182. doi:10.1128/JCM.02270-10
- 164) **Kohler RB, Winn WC Jr.** Wheat LJ Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(4):605-7.
- 165) **Knox NC, Weedmark KA, Conly J, Ensminger AW, Hosein FS, Drews SJ; and the Legionella Outbreak Investigative Team.** Unusual Legionnaires' outbreak in cool, dry Western Canada: an investigation using genomic epidemiology. *Epidemiol Infect.* 2017; 145(2):254-265.
- 166) **Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Sammons S, Rowe LA, Sheth M, Frace M, Lucas CE, Loparev VN, Raphael BH, Winchell JM.** Three genome sequences of *Legionella pneumophila* subsp. *pascuallei* associated with colonization of a health care facility. *Genome Announc* 2016; 4(3):e00335-16. doi:10.1128/genomeA.00335-16.
- 167) **Kozera B, Rapacz M.** Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013; 54(4):391-406.
- 168) **La Scola B, Mezi L, Weiller PJ, Raoult D.** Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(1):365-6.
- 169) **Lam MC, Ang LW, Tan AL, James L, Goh KT.** Epidemiology and control of legionellosis, singapore. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(7):1209-15. doi: 10.3201/eid1707.101509.
- 170) **Lau HY, Ashbolt NJ.** The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(2):368-78. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04208.x.
- 171) **Lévesque S, Plante PL, Mendis N, Cantin P, Marchand G, Charest H, Raymond F, Huot C, Goupil-Sormany I, Desbiens F, Faucher SP, Corbeil J, Tremblay C.** Genomic characterization of a large outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains in Quebec City, 2012. *PLoS One.* 2014; 9(8):e103852. doi: 10.1371/journal.pone.0103852.
- 172) **Lévesque S, Lalancette C, Bernard K, Pacheco AL, Dion R, Longtin J, Tremblay C.** Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates in the Province of Quebec from 2005 to 2015. *PLoS One.* 2016; 11(10):e0163818. doi: 10.1371/journal.pone.0163818.

- 173) **Lettinga, K. D., A. Verbon, G. J. Weverling, J. F. Schellekens, J. W. Den Boer, E. P. Yzerman, J. Prins, W. G. Boersma, R. J. van Ketel, J. M. Prins, P. Speelman.** Legionnaires' disease at a Dutch flower show: prognostic factors and impact of therapy. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:1448–1454.
- 174) **Leroy Q, Raoult D.** Review of microarray studies for host-intracellular pathogen interactions. *Microbiol Methods.* 2010; 81(2):81-95. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.008.
- 175) **Levin AS, Caiaffa Filho HH, Sinto SI, Sabbaga E, Barone AA, Mendes CM.** An outbreak of nosocomial Legionnaires' disease in a renal transplant unit in São Paulo, Brazil. *Legionellosis Study Team. J Hosp Infect.* 1991; 18(3):243-8.
- 176) **Li JS, O'Brien ED, Guest C.** A review of national legionellosis surveillance in Australia, 1991 to 2000. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2002; 26(3):461-8 (disponível em: <http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-pubs-cdi-2002-cdi2603-htm-cdi2603q.htm>)
- 177) **Li L, Mendis N, Trigui H, Faucher SP.** Transcriptomic changes of *Legionella pneumophila* in water. *BMC Genomics.* 2015; 16:637. doi: 10.1186/s12864-015-1869-6.
- 178) **Li W, Raoult D, Fournier PE.** Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33(5):892-916. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x
- 179) **Lindsay DS, Brown AW, Brown DJ, Pravinkumar SJ, Anderson E, Edwards GF.** *Legionella longbeachae* serogroup 1 infections linked to potting compost. *J Med Microbiol.* 2012; 61(2):218-22. doi: 10.1099/jmm.0.035857-0.
- 180) **Ling CL, McHugh TD.** Rapid detection of atypical respiratory bacterial pathogens by real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2013; 943: 125-33. doi: 10.1007/978-1-60327-353-4\_8.
- 181) **Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, Verweij JJ, Taniuchi M, Sobuz SU, Haque R, Haverstick DM, Houtp ER.** A laboratory developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (2): 472–480 doi:10.1128/JCM.02658-12
- 182) **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
- 183) **Lu X, Mo ZY, Zhao HB, Yan H, Shi L.** LAMP-based method for a rapid identification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 92(1):179-87. doi: 10.1007/s00253-011-3496-8
- 184) **Lück PC, Bender L, Ott M, Helbig JH, Hacker J.** Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 6 strains isolated from a hospital warm water supply over a three-year period by using genomic long-range mapping techniques and monoclonal antibodies. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(11):3226-31.
- 185) **Lück PC, Helbig JH, Hagedorn HJ, Ehret W.** DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by *Legionella bozemanii* serogroup 1. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(7):2759-61.
- 186) **Lück PC, Ecker C, Reischl U, Linde HJ, Stempka R.** Culture-independent identification of the source of an infection by direct amplification and sequencing of *Legionella pneumophila* DNA from a clinical specimen. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9):3143-4
- 187) **Lück C, Helbig JH.** Characterization of *Legionella* lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol.* 2013a; 954: 381-90. doi: 10.1007/978-1-62703-161-5\_24.
- 188) **Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG.** Typing methods for legionella. *Methods Mol Biol.* 2013b; 954:119-48. doi: 10.1007/978-1-62703-161-5\_6.
- 189) **Lucidarme J, Hill DM, Bratcher HB, Gray SJ, du Plessis M, Tsang RS, Vazquez JA, Taha MK, Ceyhan M, Efron AM, Gorla MC, Findlow J, Jolley KA, Maiden MC, Borrow R.** Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect.* 2015; 71(5):544-52. doi: 10.1016/j.jinf.2015.07.007.

- 190) **Luna CM, Brea Folco J, Aruj P, Rebora K, Balsebre C, Absi R, Vay C, De Mier C, Famiglietti A.** Pneumonia due to *Legionella pneumophila*. Experience gathered in a University Hospital in Buenos Aires. *Medicina (B Aires)*. 2004;64(2):97-102.
- 191) **Machado MP, Ribeiro-Gonçalves B, Silva M, Ramirez M, Carriço JA.** Epidemiological Surveillance and Typing Methods to Track Antibiotic Resistant Strains Using High Throughput Sequencing. *Methods Mol Biol*. 2017;1520:331-355.
- 192) **Maher WE, Para MF, Plouffe JF.** Subtyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by monoclonal antibody and plasmid techniques. *J Clin Microbiol*. 1987; 25(12):2281-4.
- 193) **Mardis ER** Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008; 9: 387-402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.
- 194) **Marques MT, Bornstein N, Fleurette J.** Combined monoclonal antibody typing, multilocus enzyme electrophoresis, soluble protein profiles and plasmid analysis of clinical and environmental *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolated in a Portuguese hospital. *J Hosp Infect*. 1995; 30(2):103-10.
- 195) **Marques MT.** Contribuição para o estudo do género *Legionella* e sua ocorrência em Portugal. Tese de doutoramento, Lisboa 1996
- 196) **Marques T, Piedade J.** Susceptibility testing by E-test and agar dilution of 30 strains of *Legionella* spp. isolated in Portugal. *Clin Microbiol Infect*. 1997; 3(3):365-368
- 197) **McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, W. R. Dowdee, and Laboratory Investigation Team.** Legionnaires' disease: isolation of a *bacterium* and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med*. 1977; 297:1197-1203.
- 198) **McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM.** Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann Intern Med*. 1979; 90(4):659-61.
- 199) **McKinney RM, Porschen RK, Edelstein PH, Bissett ML, Harris PP, Bondell SP, Steigerwalt AG, Weaver RE, Ein ME, Lindquist DS, Kops RS, Brenner DJ.** *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia. *Ann Intern Med*. 1981; 94(6):739-43.
- 200) **McKinney RM, Thacker L, Wells DE, Wong MC, Jones WJ, Bibb WF.** Monoclonal antibodies to *Legionella pneumophila* serogroup 1: possible applications in diagnostic tests and epidemiologic studies. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A*. 1983; 255(1):91-5.
- 201) **McNealy T, Newsome AL, Johnson RA, and Berk SG.** Impact of amoebae, bacteria and *Tetrahymena* on *Legionella pneumophila* multiplication and distribution in an aquatic environment. In: Marre R, AbuKwaik Y, Bartlett C, Cianciotto NP, Fields BS, Frosch M, Hacker J, and Lück PC (eds.) *Legionella*. ASM Press, Washington, 2002; 170–175.
- 202) **Mentasti M, Fry NK, Afshar B, Palepou-Foxley C, Naik FC, Harrison TG.** Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(8):2017-28. doi: 10.1007/s10096-011-1535-0.
- 203) **Mentasti M, Underwood A, Lück C, Kozak-Muiznieks NA, Harrison TG, Fry NK.** Extension of the *Legionella pneumophila* sequence-based typing scheme to include strains carrying a variant of the N-acylneuraminate cytidyltransferase gene. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(7):O435-41. doi: 10.1111/1469-0691.12459.
- 204) **Mentasti M, Afshar B, Collins S, Walker J, Harrison TG, Chalker V.** Rapid investigation of cases and clusters of Legionnaires' disease in England and Wales using direct molecular typing. *J Med Microbiol*. 2016; 65(6):484-93. doi: 10.1099/jmm.0.000257.

- 205) **Mercante JW, Winchell JM.** Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(1):95-133. doi: 10.1128/CMR.00029-14.
- 206) **Mercante JW, Morrison SS, Desai HP, Raphael BH, Winchell JM.** Genomic Analysis Reveals Novel Diversity among the 1976 Philadelphia Legionnaires' Disease Outbreak Isolates and Additional ST36 Strains. PLoS One. 2016; 11(9):e0164074. doi: 10.1371/journal.pone.0164074.
- 207) **Miles AA, Misra SS, Irwin JO.** The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg (Lond). 1938; 38(6):732-49.
- 208) **Ministry of Health, Singapore (MOH).** Review of the epidemiology and control of legionellosis in Singapore, 2000-2010. Epidemiol News Bull 2011; 37 (3): 50-60 (disponível em: [https://www.moh.gov.sg/content/dam/moh\\_web/Statistics/Epidemiological\\_News\\_Bulletin/2011/ENB03Q\\_11.pdf](https://www.moh.gov.sg/content/dam/moh_web/Statistics/Epidemiological_News_Bulletin/2011/ENB03Q_11.pdf))
- 209) **Moffat JF, Tompkins LS.** A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. Infect Immun. 1992; 60(1):296-301.
- 210) **Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE.** Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt 3):273-84. doi: 10.1099/jmm.0.014100-0
- 211) **Molmeret M, Abu Kwaik Y.** How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? Trends Microbiol. 2002; 10(6):258-60.
- 212) **Molmeret M, Bitar DM, Han L, Kwaik YA.** Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Microbes Infect. 2004; 6(1):129-39.
- 213) **Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y.** Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(1):20-8.
- 214) **Molmeret M, Jones S, Santic M, Habyarimana F, Esteban MT, Kwaik YA.** Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. Environ Microbiol. 2010; 12(3):704-15. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02114.x.
- 215) **Moran-Gilad J, Mentasti M, Lazarovitch T, Huberman Z, Stocki T, Sadik C, Shahar T, Anis E, Valinsky L, Harrison TG, Grotto I; ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI).** Molecular epidemiology of Legionnaires' disease in Israel. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(7):690-6. doi: 10.1111/1469-0691.12425.
- 216) **Moran-Gilad J, Prior K, Yakunin E, Harrison TG, Underwood A, Lazarovitch T, Valinsky L, Luck C, Krux F, Agmon V, Grotto I, Harmsen D.** Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. Euro Surveill. 2015; 20(28). pii: 21186.
- 217) **Muder RR, Yu VL.** Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. Clin Infect Dis. 2002; 35(8):990-8.
- 218) **Murdoch DR.** Diagnosis of Legionella infection. Clin Infect Dis. 2003; 36(1):64-9.
- 219) **National Notifiable Diseases Surveillance System (NNDSS).** Australia's notifiable disease status, 2014: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System (disponível em: [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-cdi4001-pdf-content.htm/\\$FILE/cdi4001e.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-cdi4001-pdf-content.htm/$FILE/cdi4001e.pdf)).
- 220) **Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL.** Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev. 2010; 23(2):274-98. doi: 10.1128/CMR.00052-09
- 221) **Ng V, Tang P, Fisman DN.** Our evolving understanding of legionellosis epidemiology: learning to count. Clin Infect Dis. 2008; 47(5):600-2. doi: 10.1086/590558.



- 222) **Nygard K, Werner-Johansen Ø, Rønsen S, Caugant DA, Simonsen Ø, Kanestrøm A, Ask E, Ringstad J, Ødegard R, Jensen T, Krogh T, Høiby EA, Ragnhildstveit E, Aaberge IS, Aavitsland P.** An outbreak of legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(1):61-9. doi: 10.1086/524016.
- 223) **O'Connor BA, Carman J, Eckert K, Tucker G, Givney R, Cameron S.** Does using potting mix make you sick? Results from a *Legionella longbeachae* case-control study in South Australia. *Epidemiol Infect.* 2007;135(1):34-9
- 224) **O'Loughlin RE, Kightlinger L, Werpy MC, Brown E, Stevens V, Hepper C, Keane T, Benson RF, Fields BS, Moore MR.** Restaurant outbreak of Legionnaires' disease associated with a decorative fountain: an environmental and case-control study. *BMC Infect Dis.* 2007;7:93.
- 225) **Osterholm MT, Chin TDY, Osborne DO, Dull HB, Dean AG, Fraser DW, Hayes PS, Hall WN.** A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol.* 1983; 117(1):60-7.
- 226) **Ott M, Bender L, Marre R, Hacker J.** Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(4):813-5.
- 227) **Pancer K, Stypulkowska-Misiurewicz H.** Pontiac fever--non-pneumonic legionellosis]. *Przegl Epidemiol.* 2003; 57(4):607-12
- 228) **Para, MF, and Plouffe JF.** Production of monoclonal antibodies to *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 6. *J.Clin. Microbiol.* 1983; 18:895-900.
- 229) **Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K.** Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008; 18(6):407-21. doi: 10.1002/rmv.593.
- 230) **Parr A, Whitney EA, Berkelman RL.** Legionellosis on the Rise: A Review of Guidelines for Prevention in the United States. *J Public Health Manag Pract.* 2015; 21(5):E17-26. doi: 10.1097/PHH.0000000000000123
- 231) **Pearce MM, Theodoropoulos N, Noskin GA, Flaherty JP, Stemper ME, Aspeslet T, Cianciotto NP, Reed KD.** Native valve endocarditis due to a novel strain of *Legionella*. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3340-2. doi: 10.1128/JCM.01066-11.
- 232) **Pelaz C, Cano R, Chico M, Asensio GI, Bellido B, Iascu A, Perez I, Ortega R, Gutiérrez G and the outbreak investigation team.** A large community outbreak of Legionnaires' Disease in Manzanares, Ciudad Real, Spain. Comunicação oral apresentada "7th annual meeting of the ELDSNet", Amesterdão, 2016.
- 233) **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9):e45.
- 234) **Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Franzus MJ.** Role of keto acids and reduced-oxygen-scavenging enzymes in the growth of *Legionella* species. *J Clin Microbiol.* 1986; 23(1):33-42
- 235) **Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, Lortholary O, Zumla A, Abubakar I.** Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(10):1011-21. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70713-3.
- 236) **Potts A, Donaghy M, Marley M, Othieno R, Stevenson J, Hyland J, Pollock KG, Lindsay D, Edwards G, Hanson MF, Helgason KO.** Cluster of Legionnaires' disease cases caused by *Legionella longbeachae* serogroup 1, Scotland, August to September 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(50): pii=20656. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.50.20656>
- 237) **Price CT, Abu Kwaik Y.** The transcriptome of *Legionella pneumophila*-infected human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2014; 9(12): e114914. doi: 10.1371/journal.pone.0114914.

- 238) **Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW.** Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(6):1560-7.
- 239) **Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC.** Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1965-8.
- 240) **Real Decreto** 2210/95 de 28 de dezembro (BOE de 24 de janeiro) disponível em: <https://www.boe.es/boe/dias/1996/01/24/pdfs/A02153-02158.pdf>
- 241) **Real Decreto** 865/2003, de 4 de Julho disponível em: <http://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-14408>
- 242) **Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA.** *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29(2):191-205. doi: 10.1007/s10096-009-0840-3.
- 243) **Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD, Török ME.** A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open.* 2013; 3(1). pii: e002175. doi: 10.1136/bmjopen-2012-002175
- 244) **Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu Kwaik Y.** Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence.* 2013; 4(4):307-14. doi: 10.4161/viru.24290.
- 245) **Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV.** Accuracy of phenotypic methods for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates included in surveillance programs. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(7):2184-8. doi: 10.1128/JCM.00461-08.
- 246) **Ristroph JD, Hedlund KW, Allen RG.** Liquid medium for growth of *Legionella pneumophila* *J Clin Microbiol.* 1980; 11(1):19-21.
- 247) **Rittig MG, Burmester GR, Krause A.** Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol.* 1998; 6(10):384-8.
- 248) **Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD, Lewis MJ.** Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol.* 1980; 33(12):1184-8.
- 249) **Rowbotham TJ.** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 1980; 33: 1179–1183
- 250) **Rowbotham TJ.** Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol.* 1983; 36(9):978-86.
- 251) **Rowbotham TJ.** Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. *Isr J Med Sci.* 1986; 22(9):678-89
- 252) **Quero S, García-Núñez M, Párraga-Niño N, Barrabeig I, Pedro-Botet ML, de Simon M, Sopena N, Sabrià M.** Discriminatory usefulness of pulsed-field gel electrophoresis and sequence-based typing in *Legionella* outbreaks. *Future Microbiol.* 2016; 11:757-65. doi: 10.2217/fmb-2015-0030.
- 253) **Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM).** Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013; 18(4): pii=20380. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20380>
- 254) **Sabria M, Yu VL.** Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(6):368-73.
- 255) **Sahr T, Brüggemann H, Jules M, Lomma M, Albert-Weissenberger C, Cazalet C, Buchrieser C.** Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol.* 2009; 72(3):741-62. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06677.x.

- 256) **Sahr T, Rusniok C, Impens F, Oliva G, Sismeiro O, Coppée JY, Buchrieser C.** The *Legionella pneumophila* genome evolved to accommodate multiple regulatory mechanisms controlled by the CsrA-system. *PLoS Genet.* 2017; 13(2):e1006629. doi: 10.1371/journal.pgen.1006629.
- 257) **Sánchez-Busó L, Guiral S, Crespi S, Moya V, Camaró ML, Olmos MP, Adrián F, Morera V, González-Morán F, Vanaclocha H, González-Candelas F.** Genomic Investigation of a Legionellosis Outbreak in a Persistently Colonized Hotel. *Front Microbiol.* 2016; 6:1556. doi: 10.3389/fmicb.2015.01556.
- 258) **Scaturro M, Dell'eva I, Helfer F, Ricci ML.** Persistence of the same strain of *Legionella pneumophila* in the water system of an Italian hospital for 15 years. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28(9):1089-92.
- 259) **Schoonmaker D, Heimberger T, Birkhead G.** Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using PFGE for distinguishing *L. pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6):1491-8.
- 260) **Seixas R, Santos TR, Machado J, Tavares L, Bernardo F, Semedo-Lemsaddek T, Oliveira M.** Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* 1,4, [5],12:i:- R-Type ASSuT Isolates from Humans, Animals, and Environment in Portugal, 2006-2011. *Foodborne Pathog Dis.* 2016;13(11):633-641.
- 261) **Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carriço JA.** Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(11):3997-4000. doi: 10.1128/JCM.00624-11.
- 262) **Shevchuk O, Jäger J, Steinert M.** Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front Microbiol.* 2011; 2:74. doi: 10.3389/fmicb.2011.00074.
- 263) **Shin S, Roy CR.** Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* 2008; 10(6):1209-20. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01145.x.
- 264) **Shivaji T, Sousa Pinto C, San-Bento A, Oliveira Serra LA, Valente J, Machado J, Marques T, Carvalho L, Nogueira PJ, Nunes B, Vasconcelos P.** A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19(50):pii=20991. Article DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.50.20991>
- 265) **Simonsen Ø, Wedege E, Kanestrøm A, Bolstad K, Aaberge IS, Ragnhildstveit E, Ringstad J.** Characterization of the extent of a large outbreak of Legionnaires' disease by serological assays. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:163. doi: 10.1186/s12879-015-0903-2.
- 266) **Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS.** MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015; 6: 791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791
- 267) **Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ.** Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(3):512-30.
- 268) **Smith SS, Ritger K, Samala U, Black SR, Okodua M, Miller L, Kozak-Muiznieks NA, Hicks LA, Steinheimer C, Ewaidah S, Presser L, Siston AM.** Legionellosis Outbreak Associated With a Hotel Fountain. *Open Forum Infect Dis.* 2015; 2(4):ofv164. doi: 10.1093/ofid/ofv164.
- 269) **Sopena N, Sabrià M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, García-Núñez M, Domínguez J, Matas L.** Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21(12):845-8.
- 270) **Sonder GJ, van den Hoek JA, Bovée LP, Aanhane FE, Worp J, Du Ry van Beest Holle M, van Steenberghe JE, den Boer JW, Ijzerman EP, Coutinho RA.** Changes in prevention and outbreak management of Legionnaires' disease in the Netherlands between two large outbreaks in 1999 and 2006. *Euro Surveill.* 2008;13(38):pii=18983. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18983>
- 271) **Sousa C, Silva L, Grosso F, Lopes J, Peixe L.** Development of a FTIR-ATR based model for typing clinically relevant *Acinetobacter baumannii* clones belonging to ST98, ST103, ST208 and ST218. *J Photochem Photobiol B.* 2014; 133:108-14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.015.

- 272) **Steele TW, Lanser J, Sangster N.** Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56(1):49–53.
- 273) **Steensels D, Reynders M, Descheemaeker P, Curran MD, Jacobs F, Denis O, Delforge ML, Montesinos I.** Clinical evaluation of a multi-parameter customized respiratory TaqMan(®) array card compared to conventional methods in immunocompromised patients. *J Clin Virol*; 72:36-41. doi: 10.1016/j.jcv.2015.08.022
- 274) **Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J.** Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(5):2047-53.
- 275) **Steinert M, Hentschel U, Hacker J.** *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26(2):149-62.
- 276) **Struelens MJ.** Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect.* 1996; 2(1):2-11.
- 277) **Tapper EB, Afdhal NH.** Is 3 the new 1: perspectives on virology, natural history and treatment for hepatitis C genotype 3. *J Viral Hepat.* 2013; 20(10):669-77. doi: 10.1111/jvh.12168.
- 278) **Taylor M, Ross K, Benthall R.** *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol.* 2009; 58(3):538-47. doi: 10.1007/s00248-009-9514-z.
- 279) **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9):2233-9.
- 280) **Terranova W, Cohen ML, Fraser DW.** 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet.* 1978; 2(8081):122-4
- 281) **Thacker SB, Bennett JV, Tsai TF, Fraser DW, McDade JE, Shepard CC, Williams KH Jr, Stuart WH, Dull HB, Eickhoff TC.** An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. *J Infect Dis.* 1978; 138(4):512-9
- 282) **Tijet N, Tang P, Romilowych M, Duncan C, Ng V, Fisman DN, Jamieson F, Low DE, Guyard C.** New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(3):447-54. doi: 10.3201/eid1603.081689.
- 283) **Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P, Mathieu L.** Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health.* 2006; 6:112. doi:10.1186/1471-2458-6-112
- 284) **Tsai TF, Finn DR, Plikaytis BD, McCauley W, Martin SM, Fraser DW.** Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med.* 1979; 90(4):509-17.
- 285) **Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG.** Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC Microbiol.* 2013; 13:302. doi: 10.1186/1471-2180-13-302.
- 286) **Vaccaro L, Izquierdo F, Magnet A, Hurtado C, Salinas MB, Gomes TS, Angulo S, Salso S, Pelaez J, Tejeda MI, Alhambra A, Gómez C, Enríquez A, Estirado E, Fenoy S, Del Aguila C.** First Case of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella anisa* in Spain and the Limitations on the Diagnosis of *Legionella non-pneumophila* Infections. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162934. doi: 10.1371/journal.pone.0162934
- 287) **Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti JC.** Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(7):1716-9.
- 288) **Vanaclocha H, Guiral S, Morera V, Calatayud MA, Castellanos M, Moya V, Jerez G, González F.** Preliminary report: Outbreak of Legionnaires' disease in a hotel in Calp, Spain, update on 22 February 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17(8):pii=20093.

- 289) **van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM)** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 Suppl 3:1-46
- 290) **van der Zee A, Peeters M, de Jong C, Verbakel H, Crielaard JW, Claas EC, Templeton KE.** Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for *Legionella* PCR are not suitable for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3):1126.
- 291) **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7):RESEARCH0034
- 292) **van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, Verhoef J, Brisse S.** Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol.* 2004; 155(2):105-12.
- 293) **van Heijnsbergen E, Schalk JA, Euser SM, Brandsema PS, den Boer JW, de Roda Husman AM.** Confirmed and Potential Sources of *Legionella* Reviewed. *Environ Sci Technol.* 2015 21; 49(8):4797-815. doi: 10.1021/acs.est.5b00142.
- 294) **van de Veerdonk FL, de Jager CP, Schellekens JJ, Huijsmans CJ, Beaumont F, Hermans MH, Wever PC.** *Legionella pneumophila* DNA in serum samples during Legionnaires' disease in relation to C-reactive protein levels. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(4):371- 376. doi: 10.1007/s10096-008-0638-8.
- 295) **VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM.** Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008;44(5):619-26. doi: 10.2144/000112776
- 296) **Vekens E, Soetens O, De Mendonça R, Echahidi F, Roisin S, Deplano A, Eeckhout L, Achtergaal W, Piérard D, Denis O, Wybo I.** Sequence based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. *Euro Surveill* 2012; 17(43): pii\_20302. [http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId\\_20302](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId_20302).
- 297) **Veríssimo A, Vesey G, Rocha GM, Marrão G, Colbourne J, Dennis PJ, da Costa MS.** A hot water supply as the source of *Legionella pneumophila* in incubators of a neonatology unit. *J Hosp Infect.* 1990; 15(3):255-63.
- 298) **Veríssimo A, Marrão G, da Silva FG, da Costa MS.** Distribution of *Legionella* spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of São Miguel, Azores. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(10):2921-7.
- 299) **Walser SM, Gerstner DG, Brenner B, Höller C, Liebl B, Herr CE.** Assessing the environmental health relevance of cooling towers-a systematic review of legionellosis outbreaks. *Int J Hyg Environ Health.* 2014; 217(2-3):145-54. doi: 10.1016/j.ijheh.2013.08.002
- 300) **Watkins ID, Tobin JO, Dennis PJ, Brown W, Newnham R, Kurtz JB.** *Legionella pneumophila* serogroup 1 subgrouping by monoclonal antibodies - an epidemiological tool. *J Hyg (Lond).* 1985; 95(2):211-6.
- 301) **Wedegge E, Bolstad K, Borgen K, Fritzsønn E, Caugant DA.** Molecular characterization of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* in Norway, 2001-2008. *Scand J Infect Dis.* 2013; 45(1):59-64. doi: 10.3109/00365548.2012.710855.
- 302) **Wei SH, Tseng LR, Tan JK, Cheng CY, Hsu YT, Cheng ET, Lu CS, Hsiao YC, Wu TH, Hsu JF, Liu MT, Mu JJ, Chen WC, Tsou TP, Hung MN, Chiang CS.** Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* in Taiwan, 2006-2010. *Int J Infect Dis.* 2014; 19:95-7. doi: 10.1016/j.ijid.2013.10.004

- 303) **Widerström M, Wiström J, Edebro H, Marklund E, Backman M, Lindqvist P, Monsen T.** Colonization of patients, healthcare workers, and the environment with healthcare-associated *Staphylococcus epidermidis* genotypes in an intensive care unit: a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1):743.
- 304) **Williams A, Lever MS.** Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and humans with Legionnaires' disease. *J Infect.* 1995; 30(1):13-6.
- 305) **Winn WC Jr.** Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev.* 1988; 1(1):60-81.
- 306) **Whiley H, Bentham R.** *Legionella longbeachae* and legionellosis. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(4):579-83. doi: 10.3201/eid1704.100446.
- 307) **Wolter N, Carrim M, Cohen C, Tempia S, Walaza S, Sahr P, de Gouveia L, Treurnicht F, Hellferscee O, Cohen AL, Benitez AJ, Dawood H, Variava E, Winchell JM, von Gottberg A.** Legionnaires' Disease in South Africa, 2012-2014. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(1):131-3. doi: 10.3201/eid2201.150972.
- 308) **Wulff-Burchfield E, Schell WA, Eckhardt AE, Pollack MG, Hua Z, Rouse JL, Pamula VK, Srinivasan V, Benton JL, Alexander BD, Wilfret DA, Kraft M, Cairns CB, Perfect JR, Mitchell TG.** Microfluidic platform versus conventional real-time polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67(1):22-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.020.
- 309) **Yiallourous PK, Papadouri T, Karaoli C, Papamichael E, Zeniou M, Pieridou-Bagatzouni D, Papageorgiou GT, Pissarides N, Harrison TG, Hadjidemetriou A.** First outbreak of nosocomial *Legionella* infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier. *Clin Infect Dis.* 2013 Jul;57(1):48-56. doi: 10.1093/cid/cit176
- 310) **Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A.** Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis.* 2002;186(1):127-8.
- 311) **Zähringer U, Knirel YA, Lindner B, Helbig JH, Sonesson A, Marre R, Rietschel ET.** The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog Clin Biol Res.* 1995; 392:113-39.

## **ANEXOS**





**Anexo I** - Distribuição dos isolados clínicos de *Lp* recolhidos em Portugal, 1987 - 2016, por ano, região e origem de aquisição da infeção, idade e género dos doentes, serogrupo e subgrupo (painel de Dresden) e ST, (n=178)

Isolado	Ano Isolamento	Região	Origem <sup>a</sup>	Doente		MAbs (Painel de Dresden)		ST
				Idade	Género	Serogrupo	Subgrupo	
HSC 1	1987	Lisboa	AH	17	M	1	Philadelphia	100
HSC 2	1988	Lisboa	AH	56	M	1	Philadelphia	100
HSC 3	1989	Lisboa	AH	72	F	1	France/Allentown	100
HSC 4	1989	Lisboa	AH	54	M	1	Philadelphia	100
HSC5	1989	Lisboa	AH	52	F	1	France/Allentown	100
HSC6	1989	Lisboa	AH	59	M	1	France/Allentown	100
HSC7	1990	Lisboa	AH	61	M	1	France/Allentown	62
HSC8	1990	Lisboa	AH	69	M	1	France/Allentown	100
HSC9	1990	Lisboa	AH	13	F	1	Philadelphia	100
HSC10	1990	Lisboa	AH	50	M	14	n.a.	1384
HSC11	1991	Lisboa	AH	60	M	1	Philadelphia	100
HSC12	1991	Lisboa	AC	57	M	14	n.a.	1383
HSC13	1991	Lisboa	AC	40	M	1	Philadelphia	103
HSC14	1992	Lisboa	AH	48	M	1	France/Allentown	100
HSC15	1992	Lisboa	AC	65	M	1	Philadelphia	23
HSC16	1994	Lisboa	AH	66	M	1	Philadelphia	100
HSC17	1995	Lisboa	AH	75	F	1	Philadelphia	100
HSC18	1995	Lisboa	AH	52	F	1	France/Allentown	100
HSC19	1995	Lisboa	AH	50	M	1	Philadelphia	100
HSC20	1995	Lisboa	AH	54	M	1	Philadelphia	100
HSC21	1995	Lisboa	AC	52	M	1	Philadelphia	1
HSC22	1996	Lisboa	AH	45	M	1	Philadelphia	100
HSC23	1996	Lisboa	AC	47	M	12	n.a.	728
HSC24	1996	Lisboa	AH	53	M	1	Philadelphia	100
HSC25	1996	Lisboa	AC	53	M	1	Benidorm	42
HSC26	1996	Lisboa	AH	60	F	1	Philadelphia	100
HSC27	1996	Lisboa	AH	53	M	1	Philadelphia	100
HSC28	1996	Lisboa	AC	59	M	1	Philadelphia	62
HSC29	1997	Lisboa	AH	64	M	1	France/Allentown	100
HSC30	1997	Lisboa	AH	56	M	1	Philadelphia	172
HSC31	1998	Lisboa	AH		M	1	France/Allentown	100
HSC32	1998	Lisboa	AH	38	M	1	France/Allentown	100
HSC33	1998	Lisboa			M	1	Knoxville	23
HSM1	1999	Lisboa				1	Knoxville	20
HSM2	1999	Lisboa				1	Philadelphia	23
HSM3	1999	Lisboa				1	Philadelphia	103
HSM4	1999	Lisboa				1	Philadelphia	103
HA	1999	Lisboa				1	Olda	1
HSM5	2000	Lisboa				1	Knoxville	16
HSM6	2000	Lisboa				8	n.a.	1324
HSM7	2000	Lisboa				10	n.a.	1343
HVNG	2000	Norte				1	Philadelphia	102
HUC	2000	Centro				1	Knoxville	99
HSC34	2001	Lisboa	AH	65	F	1	France/Allentown	100
HSC35	2002	Lisboa	AH		M	1	Philadelphia	100
HSC36	2002	Lisboa			M	1	Knoxville	94
HSC37	2003	Lisboa	AC	69	M	1	France/Allentown	101
HSC38	2003	Lisboa	AC	43	M	1	Knoxville	101

Isolado	Ano Isolamento	Região	Origem <sup>a</sup>	Doente		MAbs (Painel de Dresden)		ST
				Idade	Género	Serogrupo	Subgrupo	
E1	2004	Norte	AC	42	M	1	Philadelphia	98
E2	2005	Alentejo	AC	61	M	1	France/Allentown	62
E3	2005	Lisboa		77	F	1	Philadelphia	44
E4	2005	Norte			M	1	Knoxville	20
E5	2005	Lisboa	AH	35	M	1	France/Allentown	100
E6	2005	Lisboa	AH	48	M	1	France/Allentown	100
E7	2005	Algarve	AC	60	M	1	Knoxville	99
E8	2006	Lisboa	AH		M	1	France/Allentown	100
E9	2006	Lisboa	AH	61	M	1	France/Allentown	100
E10	2006	Lisboa	AH	67	F	1	France/Allentown	100
E11	2006	Centro	AC	29	F	1	Philadelphia	22
E12	2006	Lisboa	AH	62	F	1	France/Allentown	100
E13	2006	Lisboa	AH	80	F	1	France/Allentown	100
E15	2006	Lisboa	AC	79	M	1	Knoxville	173
E14	2007	Norte	AC	30	M	1	Philadelphia	146
E16	2007	Norte	AC	66	M	1	France/Allentown	174
E17	2007	Norte	AC	65	M	1	France/Allentown	44
E18	2007	Lisboa	AH	57	M	1	France/Allentown	100
E19	2007	Norte	AC	58	M	1	Knoxville	42
E20	2008	Norte	AC	36	M	1	Knoxville	16
E21	2008	Norte	AC	60	F	1	Knoxville	99
E22	2008	Norte	AC	47	M	1	Philadelphia	146
E23	2009	Norte	AC	64	M	1	Benidorm	42
E24	2009	Norte	AC	52	F	1	Knoxville	99
E25	2009	Lisboa	AC	68	M	1	France/Allentown	98
E26	2009	Norte	AC	65	M	1	France/Allentown	98
E27	2009	Norte	AC	49	M	1	Knoxville	785
E28	2009	Norte	AC	38	F	1	Knoxville	785
E29	2009	Norte	AC	48	M	1	Knoxville	785
E30	2010	Lisboa	AC	51	M	1	France/Allentown	75
E31	2010	Norte	AC	49	M	1	Philadelphia	22
E32	2010	Norte	AC	80	M	1	Benidorm	1009
E33	2010	Norte	AC	59	M	1	Philadelphia	1010
E34	2010	Norte	AC	54	M	1	France/Allentown	44
E35	2010	Lisboa	AC	61	F	1	France/Allentown	44
E36	2010	Norte	AC	76	M	1	Knoxville	173
E37	2011	Norte	AH	75	F	1	France/Allentown	62
E40	2011	Lisboa	AC	57	M	1	Philadelphia	37
E38	2012	Norte	AC	61	F	1	France/Allentown	44
E39	2012	Norte	AC	61	M	1	France/Allentown	44
E41	2012	Norte	AC	70	M	1	Philadelphia	436
E42	2013	Lisboa	AC	55	M	1	Knoxville	62
E43	2013	Lisboa	AC	60	M	1	France/Allentown	44
E44	2013	Norte	AC	50	M	1	France/Allentown	44
E45	2013	Norte	AC	69	F	1	Philadelphia	436
E46	2013	Lisboa	AC	81	M	1	Philadelphia	103
E47	2014	Norte		57	F	1	Knoxville	99
E48	2014	Norte	AC	58	M	1	Benidorm	65
E49	2014	Norte	AC	58	M	1	Knoxville	23
E50	2014	Norte	AC	45	M	1	Knoxville	435

Isolado	Ano Isolamento	Região	Origem <sup>a</sup>	Doente		MAbs (Painel de Dresden)		ST
				Idade	Género	Serogrupo	Subgrupo	
E51	2014	Lisboa	AC	41	M	1	France/Allentown	23
E53	2014	Norte	AC	44	M	1	Benidorm	96
E54	2014	Norte	AC	66	M	1	Knoxville	62
E55	2014	Norte	AC	60	M	1	Philadelphia	1910
E56	2014	Lisboa	AC	63	M	1	Knoxville	20
E57	2014		AC	38	M	1	Knoxville	94
E58	2014	Lisboa	AC	59	M	1	France/Allentown	1905
E59	2014	Lisboa	AC	45	M	1	France/Allentown	1905
E60	2014	Lisboa	AC	62	F	1	France/Allentown	1905
E61	2014	Lisboa	AC	65	F	1	France/Allentown	1905
E62	2014	Lisboa	AC	49	M	1	France/Allentown	1905
E63	2014	Norte	AC	41	M	1	Knoxville	94
E64	2014	Norte	AC	51	M	1	Knoxville	20
E65	2014	Norte	AC	62	M	1	Knoxville	20
E66	2014	Norte	AC	74	F	1	France/Allentown	1905
E67	2014	Lisboa	AC	47	M	1	France/Allentown	1905
E68	2014	Lisboa	AC	37	M	1	France/Allentown	1905
E69	2014	Lisboa	AC	61	M	1	France/Allentown	1905
E70	2014	Lisboa	AC	62	M	1	France/Allentown	1905
E71	2014	Lisboa	AC	73	F	1	France/Allentown	1905
E72	2014	Lisboa	AC	56	M	1	France/Allentown	1905
E73	2014	Lisboa	AC	73	M	1	France/Allentown	1905
E74	2014	Lisboa	AC	78	M	1	France/Allentown	1905
E75	2014	Lisboa	AC	41	M	1	France/Allentown	1905
E76	2014	Lisboa	AC	62	M	1	France/Allentown	1905
E77	2014	Lisboa	AC	61	M	1	France/Allentown	1905
E78	2014	Lisboa	AC	65	F	1	France/Allentown	1905
E79	2014	Lisboa	AC	55	M	1	France/Allentown	1905
E80	2014	Lisboa	AC	53	M	1	France/Allentown	1905
E81	2014	Lisboa	AC	53	F	1	France/Allentown	1905
E82	2014	Lisboa	AC	58	M	1	France/Allentown	1905
E83	2014	Lisboa	AC	56	M	1	France/Allentown	1905
E84	2014	Lisboa	AC	25	F	1	France/Allentown	1905
E85	2014	Lisboa	AC	55	F	1	France/Allentown	1905
E86	2014	Lisboa	AC	92	F	1	France/Allentown	1905
E87	2014	Lisboa	AC	71	F	1	France/Allentown	1905
E88	2014	Lisboa	AC	57	F	1	France/Allentown	1905
E89	2014	Norte	AC	48	M	1	France/Allentown	1905
E90	2014	Lisboa	AC	50	M	1	France/Allentown	1905
E91	2014	Lisboa	AC	65	M	1	France/Allentown	1905
E92	2014	Lisboa	AC	70	M	1	France/Allentown	1905
E93	2014	Lisboa	AC	69	M	1	France/Allentown	1905
E94	2014	Lisboa	AC	65	F	1	France/Allentown	1905
E95	2014	Lisboa	AC	73	F	1	France/Allentown	1905
E96	2014	Lisboa	AC	72	M	1	France/Allentown	1905

Isolado	Ano Isolamento	Região	Origem <sup>a</sup>	Doente		MAbs (Painel de Dresden)		ST
				Idade	Género	Serogrupo	Subgrupo	
E98	2014	Norte	AC	60	M	1	Philadelphia	436
E99	2014	Norte	AC	58	M	1	Knoxville	20
E101	2014	Lisboa	AC	82	M	1	Knoxville	23
E100	2015	Lisboa	AC	90	M	1	Knoxville	2184
E102	2015	Lisboa	AC	66	M	1	Knoxville	101
E103	2015	Norte	AC	62	M	1	Philadelphia	44
E104	2015	Norte	AC	77	M	1	Philadelphia	37
E105	2015	Centro	AC	51	M	1	Knoxville	2152
E106	2015	Norte	AC		M	1	Knoxville	23
E107	2015	Lisboa	AC		M	1	Benidorm	744
E108	2015	Norte	AC	49	M	1	Knoxville	23
E109	2015	Lisboa	AC	67	M	1	Benidorm	62
E110	2015	Lisboa	AC	54	M	1	Knoxville	16
E111	2015	Norte	AC	43	M	1	Benidorm	42
E112	2015	Lisboa	AC	58	M	1	France/Allentown	1905
E113	2015	Lisboa	AC	44	F	1	France/Allentown	1905
E114	2015	Lisboa	AC	66	M	1	France/Allentown	1905
E115	2015	Norte	AC	45	M	1	Knoxville	785
E116	2016					1	France/Allentown	98
E117	2016	Norte	AC		M	1	Knoxville	23
E118	2016	Norte	AC	59	M	1	Knoxville	23
E119	2016	Lisboa	AC	89	M	1	Philadelphia	103
E120	2016	Lisboa	AC	42	M	1	France/Allentown	98
E121	2016	Norte	AC	53	M	1	Philadelphia	436
E122	2016	Norte	AC	63	M	1	France/Allentown	44
E123	2016	Norte	AC	40	M	1	Knoxville	435
E124	2016					1	Philadelphia	37
E125	2016	Alentejo		84	F	1	France/Allentown	44
E126	2016	Alentejo		56	F	1	Olda	1
E127	2016	Norte	AC	46	M	1	Knoxville	23
E128	2016	Lisboa		43	M	1	Knoxville	94
E129	2016	Centro	AC		M	1	Bellingham	48
E130	2016	Norte	AC	55	M	1	Philadelphia	37
ME136676	2016	Lisboa				2-14	n.a.	1384
MX173795	2016	Lisboa			M	1	France/Allentown	44

<sup>a</sup>**AH** - Infecção adquirida no hospital; **AC** - Infecção adquirida na comunidade; **n.a.** - não aplicável;  
**Assumiu-se que a infecção foi adquirida na região do hospital que notificou o caso**

#### **A sombreado as infeções adquiridas no HospA**

**Anexo II** – Variabilidade alélica dos sete *locus* do SBT nos isolados clínicos recolhidos em Portugal, 1991 – 2016, (n=143)

ST	<i>Locus</i>						
	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA
1	1	4	3	1	1	1	1
103	1	4	3	<b>22</b>	1	1	1
744	2	3	5	5	18	1	10
22	2	3	6	10	2	1	6
96	2	3	6	10	2	1	9
23	2	3	9	10	2	1	6
75	2	3	18	13	25	5	6
20	2	3	18	15	2	1	6
728	2	10	3	28	9	4	3
146	2	10	18	10	2	1	6
16	2	10	18	10	2	1	9
435	2	10	18	15	2	1	6
<b>1384</b>	2	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>219</b>
37	3	4	1	1	14	9	11
<b>1009</b>	3	13	1	17	14	9	9
<b>1383</b>	3	<b>24</b>	1	<b>29</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>219</b>
42	4	7	11	3	11	12	9
<b>174</b>	4	8	11	5	10	12	15
99	4	8	11	5	29	12	10
44	4	8	11	10	10	12	2
1324	5	1	22	30	6	10	203
48	5	2	22	27	6	10	12
173	6	10	14	15	21	4	6
<b>101</b>	6	10	15	15	21	4	6
<b>1343</b>	6	10	21	28	4	14	207
<b>785</b>	6	<b>37</b>	15	15	21	10	9
<b>1910</b>	8	8	3	15	18	1	37
<b>98</b>	8	10	3	10	2	5	6
62	8	10	3	15	18	1	6
<b>102</b>	8	19	5	15	18	5	10
<b>1905</b>	11	14	16	10	15	13	2
94	12	8	11	5	20	12	2
65	12	8	11	5	29	12	6
1010	12	10	3	10	18	1	6
436	12	17	11	15	5	12	20
<b>2152</b>	21	14	28	5	15	29	10
<b>2184</b>	21	14	28	10	15	29	6
<b>Total Alelos</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>14</b>

A negrito os n<sup>os</sup> alélicos e STs novos



### Anexo III – SNPs nos alelos mais representativos entre os isolados clínicos recolhidos em Portugal, 1991 – 2016, (n=143)

#### Variabilidade do locus *flaA*

#### Results for job clustalo-I20170227-213455-0570-93122824-oy

Clustal Omega (1.2.4) multiple sequence alignment

```

flaA2      TCAAACCAAACCATCAATTTTCAGTATCGGCAGCATAAAAGCTTCTTCTATTGGTGGTATT
flaA8      TCAAACCAAACCATCAATTTTCAGTATCGGCAGCATAAAAGCTTCTTCTATTGGTGGTATT
flaA4      TCAAACCAAACCATCAATTTTCAGTATCGGCAGCATAAAAGCTTCTTCTATTGGTGGTATT
flaA12     TCAAACCAAACCATCAATTTTCAGTATCGGCAGCATAAAAGCTTCTTCTATTGGTGGTATT
*****

flaA2      GCCACGGCAACAGGAACAGAAGTAGCTGGTGCAGCAGCGACAGATATTACTATCGCAATT
flaA8      GCCACGGCAACAGGAACAGAAGTAGCTGGTGCAGCAGCGACAGATATTACTATCGCAATT
flaA4      GCCACGGCAACAGGAACAGAAGTAGCTGGTGCAGCAGCGACAGATATTACTATCGCAATT
flaA12     GCCACGGCAACAGGAACAGAAGTAGCTGGTGCAGCAGCGACAGATATTACTATCGCAATT
*****

flaA2      GGAGGAGGAGCAGCAACCAGTATTAACCTCTTCTGCCAATTTACCGGGGCACTAAACGGA
flaA8      GGAGGAGGAGCAGCAACCAGTATTAACCTCTTCTGCCAATTTACCGGGGCACTAAACGGA
flaA4      GGAGGAGGAGCAGCAACCAGTATTAACCTCTTCTGCCAATTTACCGGGGCACTAAACGGA
flaA12     GGAGGAGGAGCAGCAACCAGTATTAACCTCTTCTGCCAATTTACCGGGGCACTAAACGGA
*****

flaA2      CA
flaA8      CA
flaA4      CA
flaA12     CA
**

```

#### Phylogenetic Tree

*This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*

Branch length: ☐ Cladogram ☒ Real

```

      {
      flaA2 0
      flaA8 0.00549
      flaA4 0.00549
      flaA12 0

```

## Variabilidade do locus *pilE*

### Results for job clustalo-I20170227-222951-0251-61165673-oy

Clustal Omega 1.2.4) multiple sequence alignment

```

pilE8      ATGCTCAGTCAATGACATTTTATGAAGAATAGCCGTATGAAACAATCGGCGTTTACCCTG
pilE3      ATGCTCAGTCAATATACATTTTATGAAGAATAGCCGTATGAAACAATCGGCGTTTACCCTG
pilE10     ATGCTCAGTCAATGACATTTTATGAAGAATAGCCGTATGAAACAATCGGCGTTTACCCTG
*****

pilE8      GTTGAAGTTCTGATCAGCATGGTCATTATGGGAATTCTGGTTTCAATTGCCTATCCATCC
pilE3      GTTGAAGTTCTGATCAGCATGGTCATTATGGGAATTCTGGTTTCAATTGCCTATCCATCC
pilE10     GTTGAAGTTCTGATCAGCATGGTCATTATGGGAATTCTGGTTTCAATTGCCTATCCATCC
*****

pilE8      TATTTACAATATATCCAAAAATCCCGTCGTGCCGATGCTCAGCCACATTGACACAAGAT
pilE3      TATTTACAATATATCCAAAAATCCCGTCGTGCCGATGCTCAGCCACATTGACACAAGAT
pilE10     TATTTACAATATATCCAAAAATCCCGTCGTGCCGATGCTCAGCCACATTGACACAAGAT
*****

pilE8      CAAATATTTTAGAACGCTGCTATCCACAGAATTTTCTTATGCTGCGGCGTGTGGCGCC
pilE3      CAAATATTTTAGAACGCTGCTATCCACAGAATTTTCTTATGCTGCGGCGTGTGGCGCC
pilE10     CAAATATTTTAGAACGCTGCTATCCACAGAATTTTCTTATGCTGCGGCGTGTGGCGCC
*****

pilE8      CTACCAGCATTTCTCAAACAACGTCGAATCGGATATATACTATCAATATTTCAAACCTG
pilE3      CTACCAGCATTTCTCAAACAACGTCGAATCGGATATATACTATCAATATTTCAAACCTG
pilE10     CTACCAGCATTTCTCAAACAACGTCGAATCGGATATATACTATCAATATTTCAAACCTG
*****

pilE8      ACAGCCACAACGTATACCTTAACTSCAACCCCT
pilE3      ACAGCCACAACGTATACCTTAACTSCAACCCCT
pilE10     ACAGCCACAACGTATACCTTAACTSCAACCCCT
*****

```

## Phylogenetic Tree

*This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*

Branch length: ☐ Cladogram ☒ Real

```

{
  pilE8 0.03003
  pilE3 0.00601
  pilE10 0.02102
}

```



Variabilidade do locus asd**Results for job clustalo-I20170227-211827-0044-74751919-pg**

Clustal Omega CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

asd3      CGCTGTTGGTATTAGTCGTATTAATGTGGCGACTTACCAGTCTGTTTCCGGGACTGGCAA
asd11     CGCTGTTGGTATTAGTCGTATTAATGTGGCGACTTACCAGTCTGTTTCCGGGACTGGCAA
asd9      CGCTGTTGGTATTAGTCGTATTAATGTGGCGACTTACCAGTCTGTTTCCGGGACTGGCAA
asd18     CGCTGTTGGTATTAGTCGTATTAATGTGGCGACTTACCAGTCTGTTTCCGGGACTGGCAA
*****

asd3      AAAAGCCATCAGCGAACTGGTTGCTCAGGTAGGCGATCTTTTAAATGGGAGACCAGCTAA
asd11     AAAAGCCATCAGCGAACTGGTTGCTCAGGTAGGCGATCTTTTAAATGGGAGACCAGCTAA
asd9      AAAAGCCATCAGCGAACTGGTTGCTCAGGTAGGCGATCTTTTAAATGGGAGACCAGCTAA
asd18     AAAAGCCATCAGCGAACTGGTTGCTCAGGTAGGCGATCTTTTAAATGGGAGACCAGCTAA
*****

asd3      TGTTCAAGTCTATCCTCAGCAAATTGCTTTTAAATGCGCTTCCTCATATTGATCAGTTCGA
asd11     TGTTCAAGTCTATCCTCAGCAAATTGCTTTTAAATGCGCTTCCTCATATTGATCAGTTCGA
asd9      TGTTCAAGTCTATCCTCAGCAAATTGCTTTTAAATGCGCTTCCTCATATTGATCAGTTCGA
asd18     TGTTCAAGTCTATCCTCAGCAAATTGCTTTTAAATGCGCTTCCTCATATTGATCAGTTCGA
*****

asd3      AGACAATGGTTATACCCGGAAGAGATGAAGATGGTCTGGGAAACCCGCAAGATTATGGA
asd11     AGACAATGGTTATACCCGGAAGAGATGAAGATGGTCTGGGAAACCCGCAAGATTATGGA
asd9      AGACAATGGTTATACCCGGAAGAGATGAAGATGGTCTGGGAAACCCGCAAGATTATGGA
asd18     AGACAATGGTTATACCCGGAAGAGATGAAGATGGTCTGGGAAACCCGCAAGATTATGGA
*****

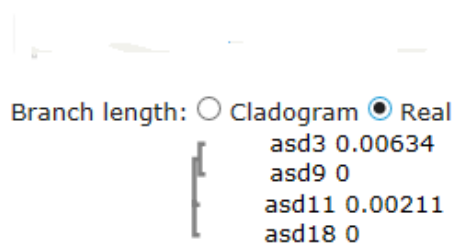
asd3      AGATGACAGCATTATGGTTAACCCCTACAGCGTTCAGGGTTCCCGTTATTTATGGGCATTC
asd11     AGATGACAGCATTATGGTTAACCCCTACAGCGTTCAGGGTTCCCGTTATTTATGGGCATTC
asd9      AGATGACAGCATTATGGTTAACCCCTACAGCGTTCAGGGTTCCCGTTATTTATGGGCATTC
asd18     AGATGACAGCATTATGGTTAACCCCTACAGCGTTCAGGGTTCCCGTTATTTATGGGCATTC
*****

asd3      TGAAGCGGTTTCATCTGGAATTAATAAGCCTTTGACGGCTGACGATGCTCGCGCGCTTTT
asd11     TGAAGCGGTTTCATCTGGAATTAATAAGCCTTTGACGGCTGACGATGCTCGCGCGCTTTT
asd9      TGAAGCGGTTTCATCTGGAATTAATAAGCCTTTGACGGCTGACGATGCTCGCGCGCTTTT
asd18     TGAAGCGGTTTCATCTGGAATTAATAAGCCTTTGACGGCTGACGATGCTCGCGCGCTTTT
*****

asd3      GGCAAAGGCACCCGGCGTTACTGTAGTGGATAATCTTTCTAAAGCAAGTTATCCCACAGC
asd11     GGCAAAGGCACCCGGCGTTACTGTAGTGGATAATCTTTCTAAAGCAAGTTATCCCACAGC
asd9      GGCAAAGGCACCCGGCGTTACTGTAGTGGATAATCTTTCTAAAGCAAGTTATCCCACAGC
asd18     GGCAAAGGCACCCGGCGTTACTGTAGTGGATAATCTTTCTAAAGCAAGTTATCCCACAGC
*****

asd3      AATTAAGAATGCAGTTCGGGCATGATGATGTTTTTGTAGGGCGCATAAGGCAGG
asd11     AATTAAGAATGCAGTTCGGGCATGATGATGTTTTTGTAGGGCGCATAAGGCAGG
asd9      AATTAAGAATGCAGTTCGGGCATGATGATGTTTTTGTAGGGCGCATAAGGCAGG
asd18     AATTAAGAATGCAGTTCGGGCATGATGATGTTTTTGTAGGGCGCATAAGGCAGG
*****

```

**Phylogenetic Tree***This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*

## Variabilidade do locus mip

### Results for job clustalo-I20170227-214410-0477-66620520-es

Clustal Omega 1.2.4) multiple sequence alignment

```

mip5      TGCCGATTTGGGGAAGAATTTTAAAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGC
mip10     TGCCGATTTGGGGAAGAATTTTAAAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGC
mip15     TGCCGATTTGGGGAAGAATTTTAAAAATCAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGC
*****

mip5      TAAAGGCATGCAAGACGCTATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAA
mip10     TAAAGGCATGCAAGACGCTATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAA
mip15     TAAAGGCATGCAAGACGCTATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAA
*****

mip5      AGACGTTCTTAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAA
mip10     AGACGTTCTTAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAA
mip15     AGACGTTCTTAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAATAA
*****

mip5      GAAAGCGGATGAAAATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCC
mip10     GAAAGCGGATGAAAATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCC
mip15     GAAAGCGGATGAAAATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCC
*****

mip5      AGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGT
mip10     AGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGT
mip15     AGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGT
*****

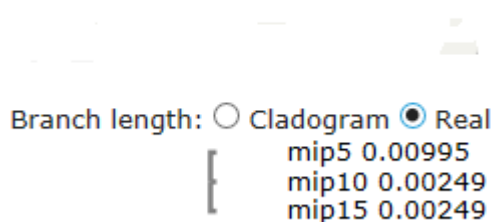
mip5      TAAACCCGCTAAATCCGATACAGTCACTGTCGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTAC
mip10     TAAACCCGCTAAATCCGATACAGTCACTGTCGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTAC
mip15     TAAACCCGCTAAATCCGATACAGTCACTGTCGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTAC
*****

mip5      CGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTT
mip10     CGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTT
mip15     CGTTTTTGACAGTACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTT
*****

```

## Phylogenetic Tree

*This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*



## Variabilidade do locus *mompS*

### Results for job clustalo-I20170227-215745-0393-43213803-pg

Clustal Omega 1.2.4) multiple sequence alignment

```

mompS10      ATGACAGTATCACTGGGCTGATTTTGCTAACTGGCACAACACTACAACAACAAGTGGGATG
mompS2       ATGACAGC GATCACTGGGCTGATTTTGCTAACTGGCACAACACTACAACAACAAGTGGGATG
mompS18      ATGACAGC GATCACTGGGCTGATTTTGCTAACTGGCACAACACTACAACAACAAGTGGGATG
*****

mompS10      CAGTTAATGCTGAATTAGGTCAATTCGTAGATTTT CAGCGCTAACAAGAAAATGCGTTTCC
mompS2       CTGTTAATGCTGAATTAGGTCAATTCGTAGATTTT CAGCGCTAACAAGAAAATGCGTTTCC
mompS18      CTGTTAATGCTGAATTAGGTCAATTCGTAGATTTT CAGCGCTAACAAGAAAATGCGTTTCC
*****

mompS10      ACGGCGGTGTTCAATACGCTCGCATTGAAGCTGATGTGAACCGTTATTTCAATAACTTTG
mompS2       ACGGCGGTGTTCAATACGCTCGCATTGAAGCTGATGTGAACCGTTATTTCAATAACTTTG
mompS18      ACGGCGGTGTTCAATACGCTCGCATTGAAGCTGATGTGAACCGTTATTTCAATAACTTTG
*****

mompS10      CCTTTAACGGATTCAACTCTAAGTTCAATGGCTTTGGTCCTCGCACTGGTTTAGACATGA
mompS2       CCTTTAACGGATTCAACTCTAAGTTCAATGGCTTTGGTCCTCGCACTGGTTTAGACATGA
mompS18      CCTTTAACGGATTCAACTCTAAGTTCAATGGCTTTGGTCCTCGCACTGGTTTAGACATGA
*****

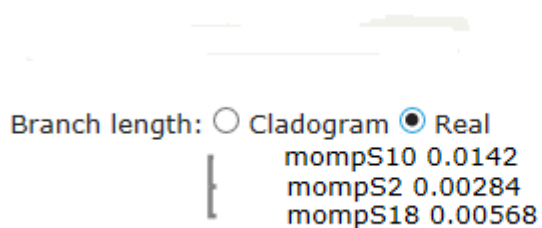
mompS10      ACTATGTATTTGGCAATGGCTTTGGTATTTATGCTAAAGCAGCTGCTGCTATTCTGGTTG
mompS2       ACTATGTATTTGGCAATGGCTTTGGTATTTATGCTAAAGCAGCTGCTGCTATTCTGGTTG
mompS18      ACTATGTATTTGGCAATGGCTTTGGTATTTATGCTAAAGCAGCTGCTGCTATTCTGGTTG
*****

mompS10      GTACCAGCGATTTCTACGATGGAATCAACTTCATTAC TGGTTCTAAAAATGC
mompS2       GTACCAGCGATTTCTACGATGGAATCAACTTCATTAC TGGTTCTAAAAATGC
mompS18      GTACCAGCGATTTCTACGATGGAATCAACTTCATTAC TGGTTCTAAAAATGC
*****

```

## Phylogenetic Tree

*This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*



### Variabilidade do locus *proA*

#### Results for job clustalo-I20170227-225150-0498-3188275-oy

Clustal Omega (1.2.4) multiple sequence alignment

```

proA1      TATGAAAACGCCTACTGGGACGGCAAAGCAAATGACCTTTGGTGATGGTGACACCATGATG
proA12     TATGAAAACGCCTACTGGGACGGCAAACCAAATGACCTTTGGTGATGGTGACACCATGATG
*****

proA1      TATCCTTTGGTTTCTCTAGGTGTAGGTGGTCATGAAGTTAGCCATGCAATTCACCTGAACAA
proA12     TATCCTTTGGTTTCTCTAGGTGTAGGTGGTCATGAAGTCAGTCACGGGTTCAACGAACAA
*****

proA1      CATCTGGACTTGAATATTTTCGGTCAGTCTGGTGGCATGAATGAGTCGTTTTTCAGATATG
proA12     CATCTGGACTTGAATATTTTCGGTCAGTCTGGTGGCATGAATGAGTCGTTTTTCAGATATG
*****

proA1      GCTGCTCAAGCTGCTGAATATTATTCAGTTGGAAAAACAGCTGGCAGATCGGCCCGGAA
proA12     GCTGCCCAAGCTGCTGAATATTATTCAGTTGGAAAAACAGCTGGCAATCGGCCCGGAA
*****

proA1      ATAATGAAAGAAGACAGTGGTTATGACGCATTGCGTTACATGGATAAACCAAGCCGTGAT
proA12     ATAATGAAAGAAGACAGTGGTTATGACGCATTGCGTTATATGGATAAACCAAGCCGTGAT
*****

proA1      GGTATGTCTATTGATGTAGCTGATGATTATTATGGCGGGTTAGATGTTTCACTTCCAGT
proA12     GGTATGTCTATTGATGTAGCTGATGATTATTATGGCGGGTTAGATGTTTCACTTCCAGT
*****

proA1      GGAGTGATAACCATTATTCTACATATTAGCTAATCAACCTAAT
proA12     GGAGTGATAACCATTATTCTACATATTAGCTAATCAACCTAAT
*****

```

### Phylogenetic Tree

*This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*

Branch length: ☐ Cladogram ☒ Real

proA1 0.02469

proA12 0.02469

## Variabilidade do locus neuA

### Results for job clustalo-I20170227-220935-0355-75534795-es

Clustal Omega (1.2.4) multiple sequence alignment

```

neuA2      GATACTTCGGATGTGATTTCATACTGTTATTGACCTCCTGTTTAAGTTTCAGCAAATGGAG
neuA6      GATACTTCGGATGTGATTTCATACTGTTATTGACCTCCTGTTTAAGTTTCAGCAAATGGAG
neuA9      GATACTTCGGATGTGATTTCATACTGTTATTGACCTCCTGTTTAAGTTTCAGCAAATGGAG
*****

neuA2      GTTGTTTTGGACAGTGTATTGCTGTTTACAACCAACTTCTCCATTTCAGGAAGCCAGAAACC
neuA6      GTTGTTTTGGACAGTGTATTGCTGTTTACAACCAACTTCTCCATTTCAGGAAGCCAGAAACC
neuA9      GTTGTTTTGGACAGTGTATTGCTGTTTACAACCAACTTCTCCATTTCAGGAAGCCAGAAACC
*****

neuA2      ATAAGACATGCTGTTGAAATACATCAAGCAACGGGAAAAAGTGTCGTTTCAGTTAGTCCC
neuA6      ATAAGACATGCTGTTGAAATACATCAAGCAACGGGAAAAAGTGTCGTTTCAGTTAGTCCC
neuA9      ATAAGACATGCTGTTGAAATACATCAAGCAACGGGAAAAAGTGTCGTTTCAGTTAGTCCC
*****

neuA2      ATCTCTTTAAAGCCTTCTTGGTGTCAGAAGCATTGATAGCCAAGGCAATTTGGTTAAGCCA
neuA6      ATCTCTTTAAAGCCTTCTTGGTGTCAGAAGCATTGATAGCCAAGGCAATTTGGTTAAGCCA
neuA9      ATCTCTTTAAAGCCTTCTTGGTGTCAGAAGCATTGATAGCCAAGGCAATTTGGTTAAGCCA
*****

neuA2      GACTTTTTCAGGATCTTGAAATTTATTGCAACGAGAATCCAATTTATAAATTAAATGGG
neuA6      GACTTTTTCAGGATCTTGAAATTTATTGCAACGAGAATCCAATTTATAAATTAAATGGG
neuA9      GACTTTTTCAGGATCTTGAAATTTATTGCAACGAGAATCCAATTTATAAATTAAATGGG
*****

neuA2      TCAATTTATATTGCAACAGCTAAACAAATTATCGAAAATAAGAGTTTATAGC
neuA6      TCAATTTATATTGCAACAGCTAAACAAATTATCGAAAATAAGAGTTTATAGC
neuA9      TCAATTTATATTGCAACAGCTAAACAAATTATCGAAAATAAGAGTTTATAGC
*****

```

## Phylogenetic Tree

*This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.*

Branch length: ☐ Cladogram ☒ Real

```

{
  neuA2 0.01977
  neuA6 0
  neuA9 0.00282

```



## Anexo IV – Tipificação dos isolados recuperados no HospA, 1987 – 2012

## A - Isolados clínicos recuperados de casos de DLAH, 1987 - 2007

Isolado	Ano	SBT	MAbs	AFLP	
		ST	Subgrupo	AFLP tipo	Semelhança (%)
HSC 1	1987	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm./013B London / 013 London	92
HSC 2	1988	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm./013B London / 013 London	92
HSC 3	1989	<b>100</b>	Allentown/France	030 Stockholm./013B London / 013 London	88
HSC 4	1989	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
HSC 5	1989	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
HSC 6	1989	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
HSC 7	1990	62	France/Allentown	019 Dresden	94
HSC 8	1990	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
HSC 9	1990	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
HSC10	1990	<b>1384</b>	n.a.		
HSC 11	1991	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
HSC 14	1992	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm./013B London	87
HSC 16	1994	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm./013B London	88
HSC 17	1995	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm./013B London / 013 London	88
HSC 18	1995	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm./013B London	87
HSC 19	1995	<b>100</b>	Philadelphia	029 London	88
HSC 20	1995	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm./013B London	87
HSC 22	1996	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm./013B London	87
HSC 24	1996	<b>100</b>	Philadelphia	003 Glasgow	91
HSC 26	1996	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm / 013B London / 013 London	92
HSC 27	1996	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm / 013B London / 013 London	87
HSC 29	1997	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm/013B London / 013 London	88
HSC30	1997	<b>172</b>	Philadelphia	028 Rome	88
HSC 31	1998	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm./013B London	76
HSC 32	1998	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm./013B London / 013 London	76
HSC 34	2001	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm / 013B London / 013 London	76
HSC 35	2002	<b>100</b>	Philadelphia	030 Stockholm / 013B London / 013 London	88
E5	2005	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	96
E6	2005	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	96
E8	2006	<b>100</b>	France/Allentown	030 Stockholm / 013B London / 013 London	92
E9	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	96
E10	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	96
E12	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	96
E13	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	91
E18	2007	<b>100</b>	France/Allentown		

n.a. Não aplicável

**B - Isolados ambientais recuperados do SDAH, 1989 – 2012**

Isolado	Ano	SBT	MAbs		
		ST	Subgrupo		
A4	1989	<b>1384</b>	France/Allentown		
A6	1989	<b>100</b>	France/Allentown		
A8	1991	<b>100</b>	France/Allentown		
A10	1991	<b>100</b>	France/Allentown		
A11	1991	<b>100</b>	France/Allentown		
A14	1993	<b>100</b>	France/Allentown		
A15	1993	<b>100</b>	France/Allentown		
A18	1993	<b>100</b>	France/Allentown		
A22	1995	<b>100</b>	France/Allentown	<b>AFLP</b>	
A23	1995	<b>100</b>	France/Allentown	<b>AFLP tipo</b>	<b>Semelhança (%)</b>
L409	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L413	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
421	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L427	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L451	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L460	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	96
L463	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L466	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L469	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	90
L473	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	90
L478	2006	<b>100</b>	Philadelphia	013 London	90
L490	2006	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	90
6303	2007	<b>100</b>	France/Allentown	013 London	90



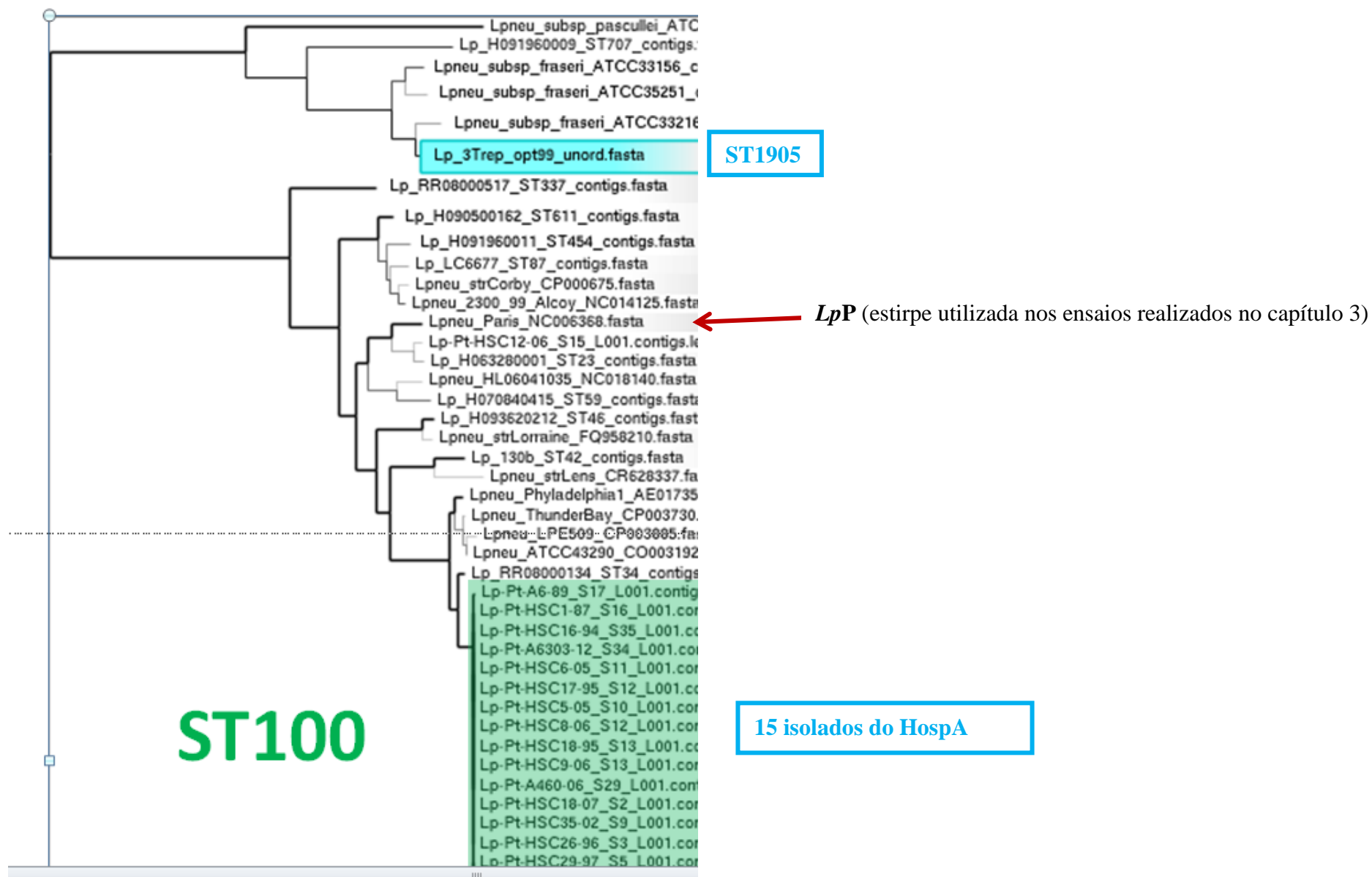
**Anexo V** – Lista de estirpes da espécie *L. pneumophila* usadas na análise filogenética e Zoom da figura 22

Estirpe	Serogrupo	ST	Número de acesso da sequência
<i>L. pneumophila</i> PtVFX/2104 (Lp 3trep-opt99)	1	1905	LORH00000000
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Philadelphia-1	1	36	AE017354.1
<i>L. pneumophila</i> Paris	1	1	CR628336.1
<i>L. pneumophila</i> Lens	1	15	CR628337.1
<i>L. pneumophila</i> Corby	1	51	CP000675.2
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> Lorraine	1	47	FQ958210.1
<i>L. pneumophila</i> 2300/99 Alcoy	1	578	CP001828.1
<i>L. pneumophila</i> 130b (Wadsworth)	1	42	CAFM01000001- CAFM01000159
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> HL06041035	1	734	FQ958211.1
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC 43290 (or 570-CO-H)	12	187	CP003192.1
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ThunderBay	6	187	CP003730.1
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> LPE509	1	780	CP003885.1
<i>L. pneumophila</i> H093620212	1	46	ERR315646
<i>L. pneumophila</i> H090500162	1	611	ERR315652
<i>L. pneumophila</i> LC6677	3	87	ERR315653
<i>L. pneumophila</i> RR08000517	9	337	ERR315658
<i>L. pneumophila</i> H063280001	1	23	ERR315663
<i>L. pneumophila</i> H091960011	1	454	ERR315665
<i>L. pneumophila</i> H070840415	1	59	ERR315666
<i>L. pneumophila</i> RR08000134	1	34	ERR315670
<i>L. pneumophila</i> H091960009	4	707	ERR315672
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> ATCC 33216 (or Dallas 1E)	5	1300	GCA_000586275.1
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> ATCC 33156 (or Los Angeles-1)	4	1334	GCA_000586315.1
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> ATCC 35251 (or Lansing-3)	15	336	GCA_000586195.1
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pasculei</i> ATCC 33737 (or U8W)	5	1335	GCA_000586255.1

## Bibliografia

**Borges V, Nunes A, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, Gonçalves P, Gomes JP.** *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. Sci Rep. 2016; 6: 26261. doi: 10.1038/srep26261

**Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG.** Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. BMC Microbiol. 2013; 13:302. doi: 10.1186/1471-2180-13-302.



**Zoom da figura 22** – Enquadramento filogenético da estirpe ST100 na diversidade genómica da espécie *L. pneumophila*

**Anexo VI –** Tipificação dos isolados clínicos não relacionados pelo SBT, MAb e AFLP, (n=24)

<b>Isolado</b>	<b>ST</b>	<b>MAbs</b>	<b>AFLP-tipo</b>	<b>SBT/MAbs/AFLP</b>
HSC 13	103	Philadelphia	002 Lugano/001B Lugano	1
HSC 15	23	Philadelphia	019 Dresden	2
HSC 21	1	Philadelphia	028 Rome	3
HSC 25	42	Benidorm	025 Stockholm	4
HSC 28	62	Philadelphia	019 Dresden	5
HSC 33	23	Knoxville	014 London	6
HSC 36	94	Knoxville	019 Dresden	7
HSC 37	101	France/Allentown	030 Stockholm	8
HSC 38	101	Knoxville	018 Glasgow	9
HSM 1	20	Knoxville	028 Rome/025 Stockholm	10
HSM 2	23	Philadelphia	017 Lugano	11
HSM 3	103	Philadelphia	028 Rome	12
HSM 4	103	Philadelphia	002 Lugano/001B Lugano	1
HSM 5	16	Knoxville	024 Copenhagen	13
HA	1	OLDA	028 Rome	14
HVNG	102	Philadelphia	019 Dresden	15
HUC	99	Knoxville	024 Copenhagen	16
E1	98	Philadelphia	010 London/031 Copenhagen	17
E2	62	France/Allentown	010 London	18
E3	44	Philadelphia	021 Lyon	19
E4	20	Knoxville	001 Lugano	20
E7	99	Knoxville	017 Lugano/024 Copenhagen	21
E11	22	Philadelphia	028 Rome	22
E15	173	Knoxville	002 B Lugano	23



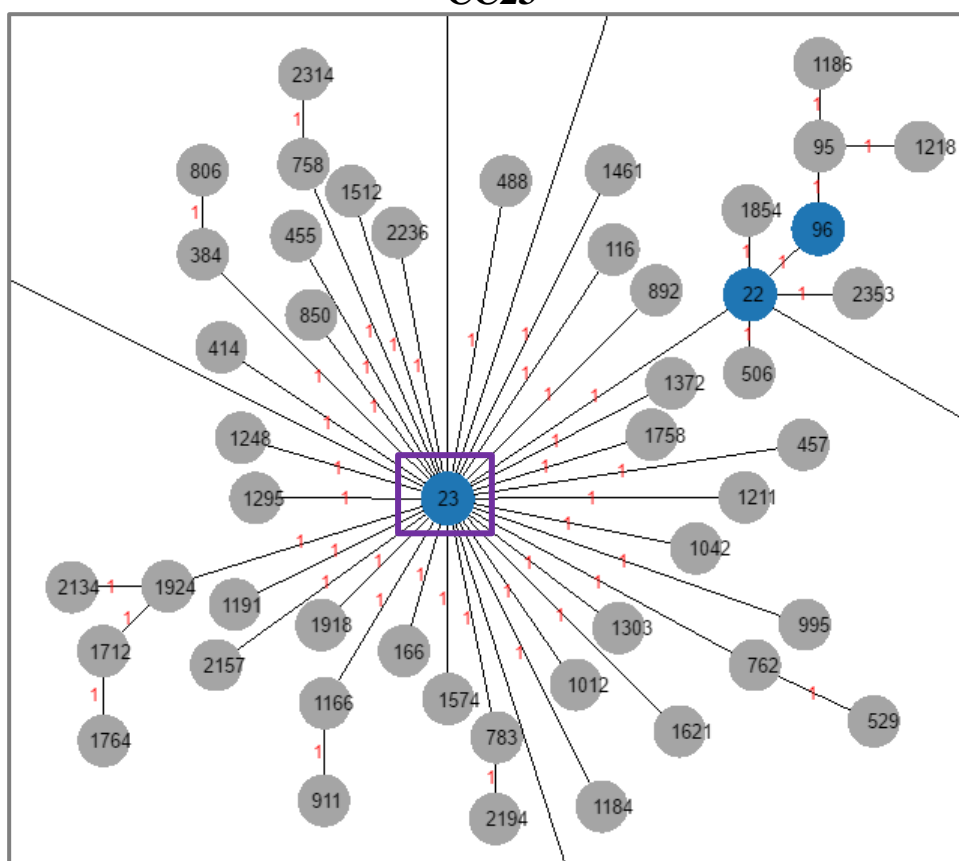
**Anexo VII** – Relação filogenética entre os STs identificados em Portugal e os STs reportados à BD-EWGLI/SBT (n=2371 STs de 11556 isolados, acedido a 24/2/17).

A vermelho os STs específicos de Portugal, a azul os STs identificados em Portugal e presentes em vários países, a roxo os STs portugueses associados com mais de 10 isolados.

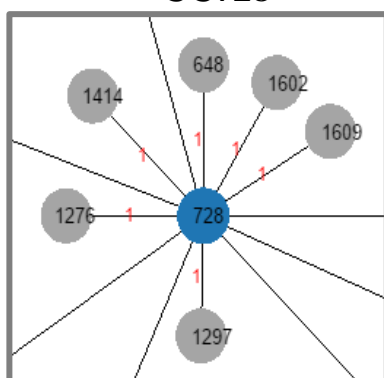
### Singletons



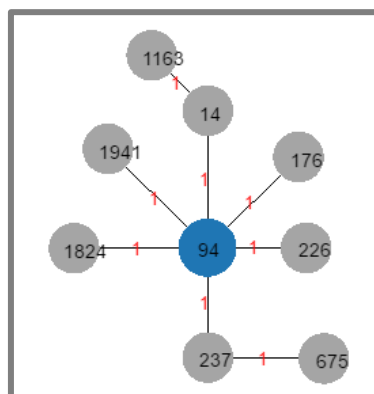
### CC23



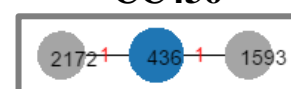
### CC728



### CC94

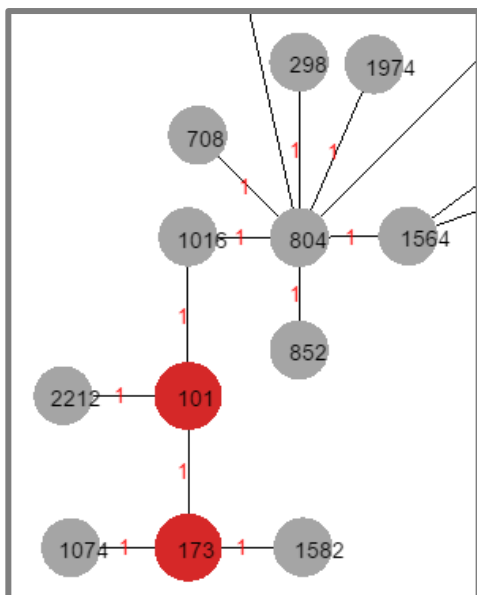


### CC436

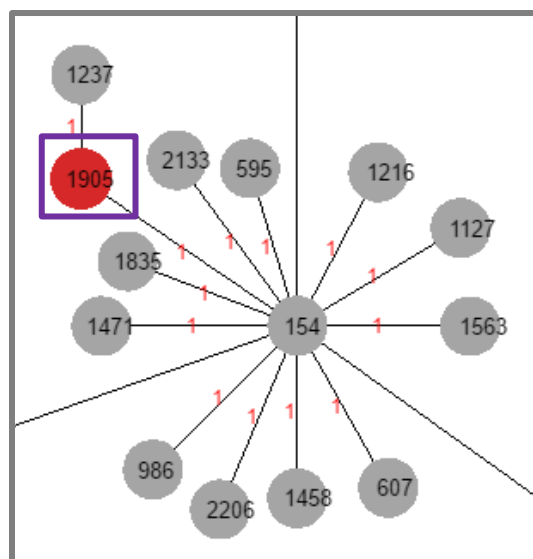




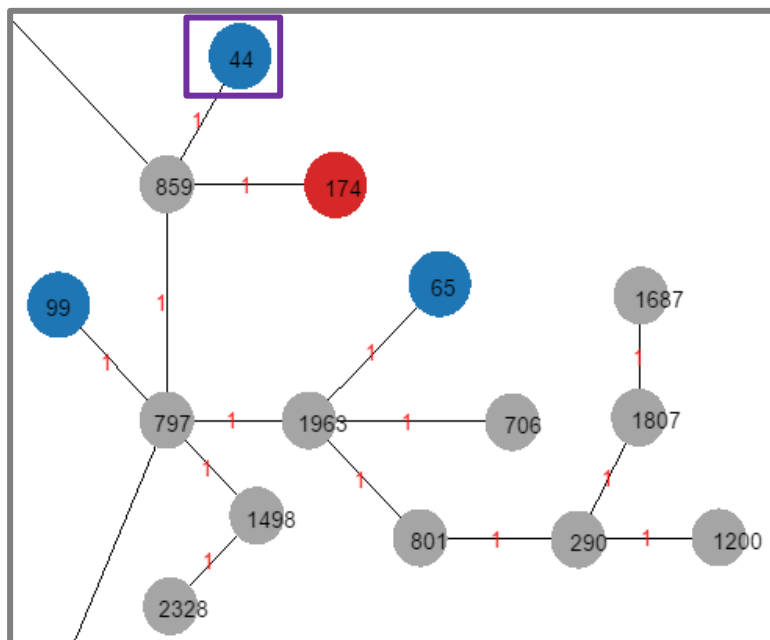
**CC804**



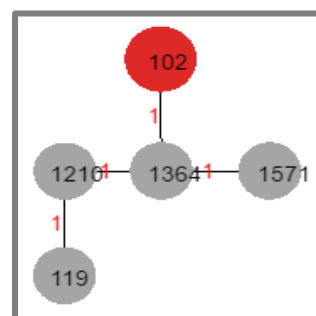
**CC154**



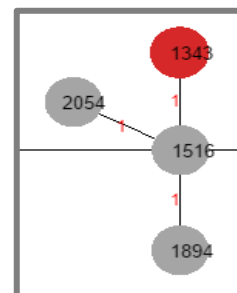
**CC797**

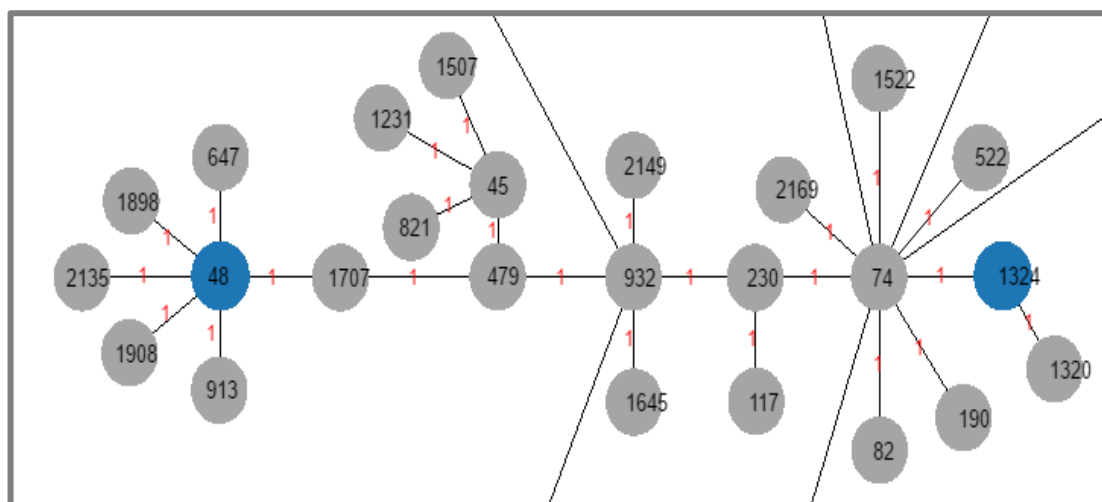
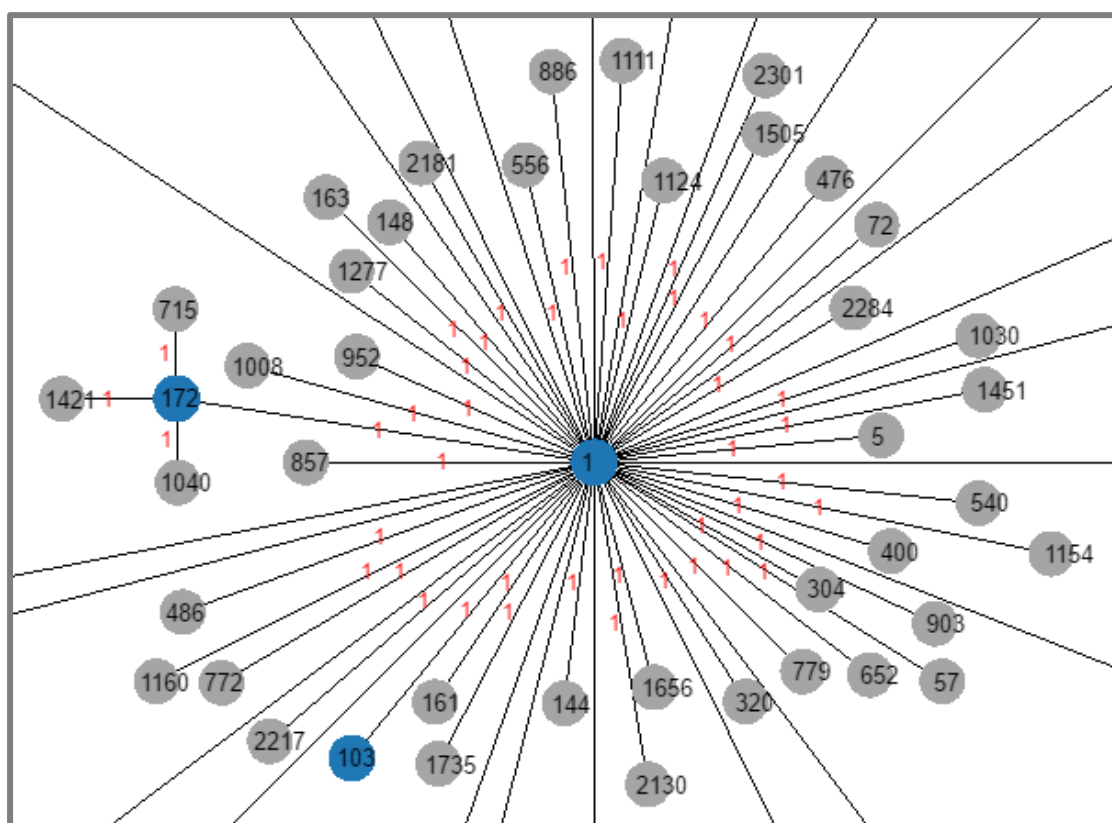


**CC1364**



**CC1516**



**CC74****CC1**



## Anexo VIII – Preparação de meios e soluções utilizadas durante o trabalho experimental

## Meios de conservação de bactérias:

## Skim milk:

Reagente	Marca	Peso-Volume
<i>Skim milk</i>	AppliChem	10g
Água destilada		100 mL
Autoclavar 120°C, 5 minutos.		
Distribuir 1 mL/ Criotubos		

## Tioglicolato:

Reagente	Marca	Peso-Volume
Tioglicolato	<i>Biokar</i>	5,67g
Água destilada		170 mL
Glicerol	<b>Merck</b>	30mL
Autoclavar 120°C, 20 minutos.		
Distribuir 1 mL/ Criotubos		

## Meio de conservação de amibas:

Reagente	Marca	Proporção
<i>Dimethyl sulfoxide</i> (DMSO)	Merck	10%
Soro de boi fetal	Gibco	90%
Filtrar (0,22 µm)		
Distribuir 1 mL/ Criotubos		

## Meio BCYE-α

Reagente	Marca	Peso -Volume
<i>Legionella</i> CYE agar base	Oxoid	2,77g
Água destilada		100 mL
Ferver. Autoclavar 120°C, 20 minutos. Arrefecer a 60°C		
<i>Legionella</i> BCYE <i>growth</i>	Oxoid	
Distribuir 20 mL/ placa de <i>Petri</i>		

## Meio BCYE-α com 100mM de Cloreto de Sódio

Reagente	Marca	Peso -Volume
<i>Legionella</i> CYE agar base	Oxoid	2,77g
Água destilada		100 mL
Ferver. Autoclavar 120°C, 20 minutos. Arrefecer a 60°C		
Solução Cloreto de sódio (Merck) - 23,38g/100mL. Filtrar (0,22 µm)		
Solução Cloreto de sódio 400mM estéril		5µL
<i>Legionella</i> BCYE <i>growth</i>	Oxoid	
Distribuir 20 mL/ placa de <i>Petri</i>		

**Meio com ACES e extrato de levedura (AYE)**

Reagente	Marca	Peso -Volume
N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)	Applichem	5g
Extrato de levedura	BiokarDiagnostics	5g
Água destilada		450 mL
Acertar (pH= 6,9)		
L-cisteína	Applichem	0,2g
Pirofosfato de ferro	Sigma	0,125g
Filtrar (0,22 µm)		

**Meio AYE com 0,3M de Cloreto de potássio**

Reagente	Marca	Peso-Volume
Cloreto de potássio	Merck	4,47g
Meio AYE	Applichem	10 mL
Filtrar (0,22 µm)		

**Meio com peptona extracto de levedura e glucose (PYG)**

Reagente	Marca	Cocentração	Peso -Volume
Cloreto de cálcio	Merck	0,05M	4mL
Di-Hidrogenofosfato de potássio	Merck	0,4M	5mL
Sulfato de Magnésio	Merck	0,25M	5mL
Di-sódio hidrogenofosfato	Applichem	0,25M	5mL
Pirofosfato de ferro	Sigma	0,005M	5mL
Citrato de Sódio	Applichem		1g
Triptona	Biokar		20g
Extracto de Levedura	Biokar		1 g
Glucose	Applichem		18g
Água destilada			475 mL
Filtrar (0,22 µm)			

**Meio mínimo para co-cultura (MMCC)**

Reagente	Marca	Cocentração	Peso -Volume
Cloreto de cálcio	Merck	0,05M	4mL
Di-Hidrogenofosfato de potássio	Merck	0,4M	5mL
Sulfato de Magnésio	Merck	0,25M	5mL
Di-sódio hidrogenofosfato	Applichem	0,25M	5mL
Pirofosfato de ferro	Sigma	0,005M	5mL
Citrato de Sódio	Applichem		1g
Água destilada			475 mL
Filtrar (0,22 µm)			

**Anexo IX** – Quantificação das UFC/mL obtidas nos ensaios de internalização e multiplicação intracelular, ensaios de sensibilidade ao sódio e de sensibilidade osmótica

***L. pneumophila* Paris (ST1)**

1º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	2,7E+06	2,7E+06	2,0E+09	5,7E+10
	2,7E+06	3,7E+06	2,7E+09	7,3E+10
	3,7E+06	3,7E+06	4,0E+09	6,0E+10
Média	3,0E+06	3,3E+06	2,9E+09	6,3E+10
Desvio padrão	5,8E+05	5,8E+05	1,0E+09	8,8E+09

2º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	7,7E+05	4,3E+06	4,0E+10	6,8E+10
	7,7E+05	5,0E+06	3,8E+10	6,2E+11
	8,3E+05	4,0E+06	1,7E+10	6,7E+10
Média	7,9E+05	4,4E+06	3,1E+10	2,5E+11
Desvio padrão	3,5E+04	5,1E+05	1,2E+10	3,2E+11

3º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	7,3E+05	6,7E+05	2,3E+10	7,0E+10
	7,7E+05	2,0E+06	5,7E+10	6,7E+10
	5,0E+05	1,7E+06	7,3E+10	6,7E+10
Média	6,7E+05	1,4E+06	5,1E+10	6,8E+10
Desvio padrão	1,4E+05	6,9E+05	2,5E+10	1,9E+09

***L. pneumophila* E18 (ST100)**

1º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	3,7E+05	6,0E+08	6,0E+07	2,0E+09
	6,7E+05	7,0E+08	7,0E+07	2,0E+09
	9,3E+05	1,1E+09	1,1E+08	2,0E+09
Média	6,5E+05	7,9E+08	7,9E+07	2,0E+09
Desvio padrão	2,8E+05	2,5E+08	2,5E+07	0,0E+00

2º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	8,7E+05	6,7E+05	6,3E+09	3,0E+10
	6,7E+05	6,0E+05	5,0E+09	3,3E+10
	8,3E+05	7,0E+05	9,7E+09	4,7E+10
Média	7,9E+05	6,6E+05	7,0E+09	3,7E+10
Desvio padrão	1,1E+05	5,1E+04	2,4E+09	8,8E+09

3º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	6,7E+05	7,0E+05	4,3E+08	6,3E+09
	6,7E+05	9,7E+05	5,3E+08	6,3E+09
	7,3E+05	9,0E+05	5,3E+08	7,3E+09
Média	6,9E+05	8,6E+05	5,0E+08	6,7E+09
Desvio padrão	3,9E+04	1,4E+05	5,8E+07	5,8E+08

***L. pneumophila* E96 (ST1905)**

1º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	3,7E+05	6,0E+05	6,0E+09	2,0E+10
	6,7E+05	8,0E+05	7,0E+09	3,2E+10
	9,3E+05	8,7E+05	1,1E+09	1,9E+10
Média	6,5E+05	7,6E+05	4,7E+09	2,4E+10
Desvio padrão	2,8E+05	1,4E+05	3,2E+09	7,3E+10

2º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	9,3E+05	2,0E+06	9,3E+09	7,0E+10
	9,7E+05	2,0E+06	8,3E+10	3,1E+11
	1,3E+06	4,3E+06	1,1E+10	1,3E+11
Média	1,1E+06	2,8E+06	3,1E+10	1,7E+11
Desvio padrão	2,0E+05	1,3E+06	4,3E+10	1,3E+11

3º Ensaio	0h	4h	14h	22h
	6,3E+05	9,7E+05	8,3E+09	3,7E+10
	7,7E+05	9,3E+05	1,2E+10	9,7E+11
	7,3E+05	9,0E+05	2,0E+10	4,7E+12
Média	7,1E+05	9,3E+05	1,4E+10	1,2E+12
Desvio padrão	6,9E+04	3,4E+04	,61E+09	2,5E+12

**Sensibilidade ao sódio**

Fase exponencial Resistente ao Sódio	1º Ensaio		2º Ensaio	
	BCYE	BCYE + NaCl	BCYE	BCYE + NaCl
	1,6E+10	2,4E+10	1,4E+11	2,0E+11
	2,6E+10	3,5E+10	1,5E+11	2,7E+11
Média	2,1E+10	2,9E+10	1,4E+11	2,4E+11
Desvio padrão	6,9E+09	7,9E+09	8,5E+09	4,9E+10

Fase estacionária Sensível ao Sódio	1º Ensaio		2º Ensaio	
	BCYE	BCYE + NaCl	BCYE	BCYE + NaCl
	1,2E+14	4,8E+09	1,0E+13	1,4E+08
	1,1E+14	2,0E+09	1,4E+13	3,0E+08
Média	1,2E+14	3,4E+09	1,2E+13	2,2E+08
Desvio padrão	2,1E+12	2,0E+09	2,9E+12	1,1E+08

**Sensibilidade ao sódio**

<b>1º Ciclo co-cultura <i>Lp-Ac</i></b> Sensível ao Sódio	1º Ensaio		2º Ensaio	
	<b>BCYE</b>	<b>BCYE + NaCl</b>	<b>BCYE</b>	<b>BCYE + NaCl</b>
	1,8E+07	2,1E+05	2,0E+07	3,9E+05
	1,8E+07	2,7E+05	2,3E+07	5,7E+05
Média	1,8E+07	2,4E+05	2,1E+07	4,8E+05
Desvio padrão	1,0E+05	2,9E+04	1,8E+06	9,0E+04

<b>2º Ciclo co-cultura <i>Lp-Ac</i></b> Sensível ao Sódio	1º Ensaio		2º Ensaio	
	<b>BCYE</b>	<b>BCYE + NaCl</b>	<b>BCYE</b>	<b>BCYE + NaCl</b>
	3,1E+09	4,3E+05	1,7E+09	6,2E+05
	1,2E+09	1,8E+05	1,8E+09	3,2E+05
Média	2,2E+09	3,0E+05	1,8E+09	4,7E+05
Desvio padrão	1,3E+09	1,7E+05	7,1E+07	2,1E+05

**Sensibilidade osmótica**

<b>Fase exponencial</b> Resistente ao KCl	1º Ensaio		2º Ensaio	
	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>
	1,7E+11	1,3E+11	1,4E+10	2,1E+10
	2,6E+11	8,4E+11	8,4E+10	1,8E+10
Média	2,1E+11	4,8E+11	4,9E+10	2,0E+10
Desvio padrão	6,6E+10	5,0E+11	5,0E+10	2,1E+09

<b>Fase estacionária</b> Resistente ao KCl	1º Ensaio		2º Ensaio	
	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>
	3,1E+10	1,3E+10	1,0E+10	1,4E+10
	2,7E+10	1,6E+10	1,4E+10	2,0E+10
Média	2,9E+10	1,4E+10	1,2E+10	1,7E+10
Desvio padrão	2,8E+09	2,1E+09	2,9E+09	4,2E+09

<b>1º Ciclo co-cultura <i>Lp-Ac</i></b> Resistente ao KCl	1º Ensaio		2º Ensaio	
	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>
	2,0E+08	2,1E+08	2,0E+07	3,9E+07
	1,8E+08	2,7E+08	2,3E+07	5,7E+07
Média	1,9E+08	2,4E+08	2,1E+07	4,8E+07
Desvio padrão	1,1E+07	2,9E+07	1,8E+06	9,0E+06

<b>2º Ciclo co-cultura <i>Lp-Ac</i></b> Resistente ao KCl	1º Ensaio		2º Ensaio	
	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>	<b>sem KCl</b>	<b>com KCl</b>
	3,1E+07	3,3E+07	1,7E+07	1,4E+07
	1,2E+07	2,8E+07	1,8E+07	2,2E+07
Média	2,2E+07	3,0E+07	1,8E+07	1,8E+07
Desvio padrão	1,3E+07	3,2E+06	7,1E+05	5,7E+06

**Ciclos sucessivos no mesmo hospedeiro**

<b>1º Ciclo</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>45h</b>
1º Ensaio	3,70E+06	4,40E+09	1,79E+09
2º Ensaio	1,00E+06	2,38E+09	2,04E+10
3º Ensaio	2,39E+06	4,20E+08	5,70E+08
Média	2,36E+06	2,40E+09	7,59E+09
Desvio padrão	1,35E+06	1,99E+09	1,11E+10

<b>2º Ciclo</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>45h</b>
1º Ensaio	5,30E+06	1,43E+11	1,11E+11
2º Ensaio	6,30E+06	3,90E+10	1,78E+09
3º Ensaio	2,22E+06	2,17E+09	6,60E+08
Média	4,61E+06	6,14E+10	3,78E+10
Desvio padrão	2,13E+06	7,30E+10	6,34E+10

Anexo X - Avaliação do transcrito por *microarrays* da *LpP* após co-cultura com *A. castellanii***A - Lista de genes com expressão aumentada após co-cultura Lp-Ac**

Gene ID	Description	FC <sup>a</sup>
lpp1316	type II secretory pathway protein LspG (V)	10,72
lpp1330	similar to hypothetical protein	6,77
lpp2607	lpp2607	6,46
lpp0094	lpp0094	6,24
lpp1612a	similar to N-terminal part of sidB protein (V)	6,04
lpp1612b	C-terminal part of <i>L. pneumophila</i> sidB protein (V)	5,34
lpp1139	lpp1139	4,79
lpp0506	lpp0506	4,66
lpp2643	similar to partition protein ParB	4,63
lpp0845	global regulator CsrA	4,51
lpp0045	similar to sterol desaturase	4,25
lpp0953	similar to kynurenine 3-monooxygenase	4,05
lpp1992	guanylate kinase	3,73
lpp2287	lpp2287	3,67
lpp2644	lpp2644	3,50
lpp1559	lpp1559	3,47
lpp1991	RNA polymerase omega subunit	3,26
lpp2093	similar to <i>L. pneumophila</i> SdeA protein	3,20
lpp1315	type II secretory pathway protein LspH	3,20
lpp0963	lpp0963	3,19
lpp2865	lpp2865	3,19
lpp2948	Highly similar to glucose-inhibited division protein A GidA	3,06
lpp2092	SdeC protein- substrate of the Dot/Icm system	3,04
lpp1993	similar to conserved hypothetical protein	2,97
lpp0503	ankyrin repeat protein	2,91
lpp2762	50S ribosomal subunit protein L13	2,91
lpp0733	lpp0733	2,80
lpp2761	30S ribosomal subunit protein S9	2,72
lpp1376	30S ribosomal protein S1	2,71
lpp1860	similar to major facilitator family transporter (phtJ)	2,69
lpp1004	similar to GTPases	2,66
lpp0590	virulence protein	2,60
lpp2947	lpp2947	2,55
lpp2742	Intracellular multiplication protein IcmW	2,50
lpp0521	icmJ/dotN	2,47
lpp2629	lpp2629	2,46
lpp2949	similar to glucose inhibited division protein B GidB	2,44
lpp1828	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	2,42
lpp0655	similar to cysteine desulfurase and to selenocysteine lyase	2,42
lpp1990	spoT (guanosine-3'-5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase)	2,42
lpl2084	lpl2084	2,39
lpp0134	some similarity with <i>L. pneumophila</i> IcmL/DotI	2,38
lpp2242	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase	2,26
lpp0735	similar to glutamine synthetase adenylyltransferase	2,23
lpp2951	similar to chromosome partitioning protein parB	2,22
lpp1951	hypothetical gene	2,21
lpp0653	similar to ABC transporter ATP-binding protein	2,20
lpp0651	similar to conserved hypothetical protein	2,19

lpp2096	sdeA	2,17
lpp0657	similar to conserved hypothetical protein	2,12
lpp2636	lpp2636	2,09
lpp2741	intracellular multiplication protein IcmV	2,09
lpp0509	icmR	2,08
lpp0193	similar to putative phage excisionase	2,07
lpp0652	similar to ABC transporter- permease component	2,06
lpp0202	Ankyrin repeat protein	2,04
lpp0699	structural toxin protein RtxA	2,03
lpp2950	Highly similar to chromosome partitioning protein ParA family	2,00
lpp2763	similar to putative ferredoxin 2fe-2s protein	1,99
lpp1126	similar to amino acid ABC transporter	1,98
lpp2409	similar to hypothetical protein	1,96
lpp0656	NifU protein family- possibly involved in the formation or repair of [Fe-S]	1,96
lpp2469	lpp2469	1,96
lpp1647	purC (Phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase)	1,95
lpp2146	similar to ketosteroid isomerase homolog	1,93
lpp0994	aroK (shikimate kinase I)	1,92
lpp2578	SdcA protein- paralog of SidC (substrate of the Dot/Icm system)	1,91
lpp2689	30S ribosomal subunit protein S2	1,90
lpp1942	lpp1942	1,88
lpp0013	similar to other protein	1,87
lpp2710	hypothetical gene	1,82
lpp0698	similar to tRNA processing ribonuclease BN	1,82
lpp2300	lpp2300	1,81
lpp0935	prfC (peptide chain release factor 3)	1,81
lpp2306	gcp (Similar to O-sialoglycoprotein endopeptidase)	1,80
lpp1100	Ankyrin repeat protein	1,80
lpp1988	similar to conserved hypothetical protein	1,80
lpp0806	similar to conserved hypothetical protein	1,80
lpp0570	similar to putative outer membrane proteins	1,76
lpp1118	Similar to B. subtilis PaiA transcriptional repressor of sporulation	1,76
lpp2977	Highly similar to peptide methionine sulfoxide reductase	1,75
lpp1709	similar to iron-sulphur cluster proteins NifU	1,69
lpp0307	similar to hydrolase	1,69
lpp1332	similar to conserved hypothetical protein	1,69
lpp2739	small basic protein SbpA	1,68
lpp2875	similar to GTP-binding protein TypA/BipA	1,67
lpp0999	ileS (Isoleucyl-tRNA synthetase)	1,62
lpp1255	similar to two component response regulator	1,62
lpp2937	putative cobalt/magnesium uptake transporter	1,59
lpp0321	similar to N-terminal part of eukaryotic RNA-binding protein precursor	1,59
lpp1137	similar to hypothetical protein	1,56
lpp2849	similar to putative coproporphyrinogen oxidase A	1,55
lpp2202	lpp2202	1,52
lpp1093	similar to beta-phosphoglucomutase	1,52
lpp2642	similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	1,50
lpp2094	lpp2094	1,50
lpp0703	similar to exodeoxyribonuclease III XthA	1,50
lpp2994	similar to protein	1,49
lpp2876	similar to probable inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	1,48
lpp2723	Highly similar to cell division ABC transporter- ATP-binding protein FtsE	1,47
lpp2086	lpp2086	1,47



lpp0568	similar to putative membrane-associated Zn-dependent protease EcfE	1,46
lpp1256	similar to intracellular septation protein	1,46
lpp0871	similar to succinyl-diaminopimelate desuccinylase	1,45
lpp2544	similar to conserved hypothetical protein	1,45
lpp2637	sidF (Substrate of the Dot/Icm system)	1,43
lpp0253	lpp0253	1,42
lpp1570	similar to hypothetical proteins	1,40
lpp0883	similar to lipopolysaccharide biosynthesis glycosyltransferase	1,38
lpp1710	similar cysteine desulfurase	1,35
lpg0041	lpg0041	1,35
lpl2839	lpl2839	1,34
lpp1501	histidyl-tRNA synthetase	1,32
lpp1839	similar to general secretion pathway protein L	1,31
lpl1069	lpl1069	1,31
lpp2602	similar to xylene monooxygenase	1,31
lpp0955	similar to eukaryotic cytokinin oxidase	1,30
lpp0132	similar to glycine cleavage system protein T	1,29
lpp0704	50S ribosomal protein L31	1,29

<sup>a</sup>FC – Fold Change

#### B - Lista de genes com expressão diminuída após co-cultura Lp-Ac

Gene ID	Description	FC
lpp1294	flagelline	0,09
lpp1177	lpp1177	0,17
lpp1293	lpp1293	0,19
lpp1340	lpp1340	0,19
lpp1900	lpp1900	0,21
lpp0162	similar to Wolinella succinogenes hypothetical protein	0,21
lpp2010	Uroporphyrinogen decarboxylase	0,22
lpp0728	similar to acetoacetate decarboxylase	0,23
lpp0161	similar to Wolinella succinogenes hypothetical protein	0,23
lpp2299	similar to alkyl hydroperoxide reductase AhpC	0,23
lpp1901	similar to conserved hypothetical protein	0,23
lpp0727	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase	0,24
lpp1291	similar to flagellar protein FliS	0,24
lpp1292	similar to flagellar hook-associated protein 2 (flagellar capping protein)	0,24
lpp0160	similar to Wolinella succinogenes hypothetical protein	0,24
lpp0969	similar to negative regulator of flagellin synthesis (Anti-sigma-28 factor)	0,24
lpp1410	similar to probable multidrug efflux protein	0,24
lpp0972	similar to enhanced entry protein EnhA	0,25
plpp0080	similar to protein	0,26
lpp1890	similar to type IV pilin PilA	0,27
lpp1116	similar to other protein- ATP binding site	0,27
lpp1902	similar to conserved hypothetical protein	0,27
lpp0541	similar to putative sigma-54 modulation protein	0,27
lpp0725	similar to hypothetical protein	0,27
lpp0729	similar to protein	0,27

lpp0090	Weakly similar to stability protein StbD	0,28
lpp1170	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	0,28
lpp2856	similar to conserved hypothetical protein	0,28
lpp0730	similar to adenylate cyclase	0,28
lpp0723	similar to conserved hypothetical protein	0,29
lpp2265	similar to conserved hypothetical protein	0,30
plpp0089	Weakly similar to stability protein StbE	0,31
lpp2497	similar to 2-(5'-triphosphoribosyl)-3-dephosphocoenzyme-A synthase	0,31
lpp2498	similar to malonyl-CoA acyl-carrier-protein transacylase	0,31
lpp2694	enhanced entry protein EnhA	0,31
lpp2478	similar to other proteins	0,32
lpp0351	regulatory protein (EAL domain)	0,33
lpp1538	some similarities to cytochrome B561	0,33
lpp0724	similar to conserved hypothetical protein	0,33
lpp0029	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	0,33
lpp2494	similar to malonate decarboxylase- beta subunit	0,34
lpp0542	RNA polymerase sigma-54 factor (sigma-L)	0,34
lpp2495	similar to malonate decarboxylase- gamma subunit	0,35
lpp1115	similar to other proteins	0,36
lpp2692	enhanced entry protein EnhC	0,36
lpp1396	similar to phosphate starvation-inducible protein PhoH	0,36
lpp2461	lpp2461	0,36
lpp2368	lpp2368	0,37
lpp0403	30S ribosomal protein S17	0,37
lpp2853	similar to conserved hypothetical protein	0,37
lpp2496	similar to phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase	0,37
lpp1854	Q-rich protein	0,38
lpp0907	weakly similar to anti-anti-sigma factor	0,39
lpp2209	lpp2209	0,39
plpp0088	similar to transcriptional regulator	0,39
lpp2603	similar to conserved hypothetical protein	0,39
lpp0905	similar to protein	0,39
lpp0299	regulatory protein (GGDEF domain)	0,40
lpp1481	Type 4 prepilin-like proteins leader peptide processing enzyme	0,40
lpp2569	similar to carbonic anhydrase	0,40
lpp0679	similar to eukaryotic proteins	0,41
lpp3028	similar to protease	0,42
lpp0399	50S ribosomal subunit protein L22	0,42
lpp0743	6 kDa chaperonin (Protein Cpn6)(groEL protein)(Heat shock protein B).	0,43
lpp1473	Legionella secretion system protein B	0,43
plpp0087	Weakly similar to alpha/beta hydrolase fold family protein	0,43
lpp1290	similar to enhanced entry protein EnhA	0,43
lpp2360	similar to metallo-beta-lactamase superfamily proteins	0,43
lpp1757	lpp1757	0,44
lpp2509	lpp2509	0,44

lpp2129	similar to multidrug efflux RND membrane fusion protein MexE	0,44
lpp2340	predicted membrane protein	0,44
lpp2659	similar to protein	0,44
lpp0392	translation elongation factor Tu	0,44
lpp0220	regulatory protein (EAL domain)	0,45
lpp2523	similar to two-component response regulator	0,45
lpp1114	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	0,45
lpp0298	Hypothetical gene	0,45
lpp0906	similar to protein	0,45
lpp0952	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	0,45
lpp0417	30S ribosomal protein S11	0,45
lpp1015	similar to long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0,46
lpp0394	50S ribosomal subunit protein L3	0,46
lpp0315	similar to C-terminal part of conserved hypothetical protein	0,46
lpp1539	weakly similar to NADP-specific glutamate dehydrogenase	0,46
lpp1739	similar to ribonucleoside-diphosphate reductase- beta subunit	0,47
lpp0355	similar to transcriptional regulator lysR family	0,47
lpp1095	lpp1095	0,47
lpp0391	translation elongation factor G	0,47
lpp1273	lpp1273	0,47
lpp2362	Chemiosmotic efflux system B protein B	0,47
lpg0327	lpg0327	0,47
lpp1903	similar to conserved hypothetical protein	0,48
lpp2341	Predicted membrane protein- similar to hypothetical protein	0,48
lpp0393	30S ribosomal subunit protein S1	0,48
lpp0512	icmO/dotL	0,48
lpp1788	similar to acetyl-CoA acetyltransferase	0,48
lpp0880	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	0,49
lpp0314	similar to oxydoreductase	0,49
lpp1653	similar to thiol:disulfide interchange protein	0,49
lpp0395	50S ribosomal subunit protein L4	0,49
lpp0396	50S ribosomal subunit protein L23	0,50
lpp2339	similar to putative cytochrome c family protein.	0,50
lpp0637	similar to conserved hypothetical protein	0,50
lpp2249	lpp2249	0,50
lpp2487	Some similarity with eukaryotic proteins	0,50
lpp0388	RNA polymerase beta subunit	0,51
lpp0411	30S ribosomal subunit protein S5	0,51
lpp0397	50S ribosomal subunit protein L2	0,51
lpp1395	similar to conserved hypothetical protein	0,51
lpp0416	30S ribosomal protein S13	0,51
lpp1640	lpp1640	0,51
lpp0683	similar to Tfp pilus assembly protein PilX	0,52
lpp0681	type-IV pilin	0,52
plpp0051	similar to transposase (Tn3 family)	0,52
lpp1741	Highly similar to lysyl-tRNA synthetase	0,52

lpp0561	similar to carboxy-terminal protease family protein	0,52
lpp1000	Lipoprotein signal peptidase	0,52
lpp1322	lpp1322	0,52
lpp2223	similar to conserved hypothetical protein	0,52
lpp2264	similar to 3-hydroxybutyrate dehydrogenase	0,53
lpp2871	similar to hypothetical protein	0,53
lpp1609	lpp1609	0,53
lpp0088	similar to other proteins	0,53
lpp1452	lpp1452	0,53
lpp2196	similar to uracil phosphoribosyltransferase (upp)	0,53
lpp2297	Superoxide dismutase [Cu-Zn] precursor	0,54
plpp0001	highly similar to partition protein ParB	0,54
lpp0726	similar to predicted esterae	0,54
lpp1218	similar to protein	0,54
lpp1743	similar to hypothetical proteins	0,54
lpp0410	50S ribosomal subunit protein L18	0,54
lpp0942	regulatory protein (GGDEF domain)	0,54
lpp0459	Weakly similar to Zinc metalloprotease	0,54
lpp1535	Sigma factor RpoE (sigma 24)	0,54
lpp0802	similar to conserved hypothetical protein	0,54
lpp1393	transcriptional regulatory protein CpxR	0,55
lpp1163	similar to predicted phosphoribosyl transferase	0,55
lpp2477	regulatory protein (GGDEF domain)	0,55
plpp0129	Some similarity with transcriptional regulator, MerR family	0,55
lpp2890	Similar to acyl-CoA hydrolase	0,56
lpp1849	lpp1849	0,56
lpp2156	Predicted integral membrane protein	0,56
lpp0036	similar to arginine transport system periplasmic binding protein	0,56
lpp0010	similar to GTP-binding protein HflX	0,56
lpp0390	30S ribosomal protein S7	0,56
lpp2630	lpp2630	0,56
lpp1454	similar to aminopeptidase N	0,56
lpp2525	similar to guanylate cyclase-related protein	0,57
lpp0226	similar to conserved hypothetical protein	0,57
lpp0412	50S ribosomal subunit protein L3	0,57
lpp2695	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	0,57
lpp2777	Putative cAMP/cGMP binding protein	0,58
lpp0997	similar to universal stress protein A	0,58
lpp2889	lpp2889	0,58
lpp2663	ATP-binding cell division protein FtsA	0,58
lpp0910	similar to conserved hypothetical protein	0,58
lpp1744	similar to chemotaxis MotB protein	0,58
lpp2840	similar to phosphoglucomutase	0,58
lpp0418	30S ribosomal subunit protein S4	0,59
lpp2958	lpp2958	0,59

lpp1644	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	0,59
lpp2282	lpp2282	0,59
lpp2857	similar to conserved hypothetical protein	0,59
lpp0014	similar to conserved hypothetical protein	0,59
lpp0352	regulatory protein (GGDEF domain)	0,59
lpp0810	Lipoic acid synthetase LipA	0,59
lpp0406	50S ribosomal protein L5	0,60
lpp1876	similar to hypothetical protein	0,60
lpp0904	similar to permease of ABC transporter	0,60
plpp0053	similar to conserved hypothetical protein	0,61
lpp2927	Thymidylate synthase	0,61
lpp0197	Similar to adenine specific DNA methylase (Mod-related)	0,61
lpp1147	lpp1147	0,62
lpp1856	similar to esterase/lipase	0,62
lpp2735	similar to aldolase	0,62
lpp0214	similar to hypothetical protein	0,62
lpp0662	similar to protein	0,62
lpp0805	similar to surface antigens (17 kDa)	0,62
lpp2778	similar to protein	0,62
lpp0389	30S ribosomal protein S12	0,62
lpp1080	similar to very-short-patch-repair endonuclease vsr	0,63
lpp1480	pilus assembly protein PilC	0,63
lpp0686	similar to type-4 fimbrial pilin related protein	0,63
lpp0780	similar to two-component sensor histidine kinase	0,63
lpp0413	50S ribosomal subunit protein L15	0,63
lpp2068	lpp2068	0,63
lpp1483	lpp1483	0,64
lpp1392	Sensor histidine kinase	0,64
lpp2255	similar to glutaredoxin Grx	0,65
lpp0830	lpp0830	0,65
lpp2174	similar to protein	0,65
lpp2665	D-alanine--D-alanine ligase A	0,65
lpp1450	lpp1450	0,65
plpp0122	similar to protein	0,66
plpp0082	similar to acetyltransferase, GNAT family	0,66
lpp1262	lpp1262	0,67
lpp2662	Cell division protein FtsZ	0,67
lpp0071	similar to transposase (ISL3 family)	0,67
lpp0409	50S ribosomal subunit protein L6	0,67
lpp2245b	similar to transposase (IS4 family)	0,67
lpp1936	lpp1936	0,68
plpp0039	similar to conjugative transfer protein TraI	0,68
lpp1607	similar to protein	0,68
lpp2182	similar to acyl-CoA synthetase	0,68

lpp1175	similar to Pseudomonas sensor protein PilS (member of the 2 component response regulator PilS/PilR involved in the regulation of the expression of the type 4 fimbriae)	0,69
lpp1234	flagellar hook-associated protein FlgL	0,70
lpp2678	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	0,71
lpp2686	similar to hypothetical protein	0,71
lpp1423	similar to dephospho-CoA kinase	0,71
lpp3034	similar to sodium-type flagellar protein MotY	0,72
plpp0083	similar to hypothetical protein	0,72
lpp2664	Cell division protein FtsQ	0,72
lpp1227	Flagellar hook protein FlgE	0,72
lpp0824	dTDP-D-glucose 4-6-dehydratase rhamnose biosynthesis	0,73
lpp0150	SdhB protein- substrate of the Dot/Icm system	0,73
lpp0453	Highly similar to C. burnetii heat shock protein HtpX	0,73
lpp2780	similar to transcriptional regulator- ArsR family	0,73
lpp1659	Aconitate hydratase	0,73
lpp1445	lpp1445	0,73
lpp2781	Some simillarity with eukaryotic proteins	0,73
plpp0084	similar to pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0,73
lpp2338	similar to protein	0,73
lpp0017	lpp0017	0,74
plpp0067	similar to multidrug resistance ABC transporter ATP-binding protein	0,74
lpp1645	Phosphoribosylamine-glycine ligase	0,74
plpp0121	Weakly similar to acetyltransferase	0,74
lpp1306	similar to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,74
lpp0225	similar to conserved hypothetical protein	0,75
lpp2334	similar to ATP synthase alpha chain	0,76
lpp2218	similar to protein	0,76
lpp0731	similar to conserved hypothetical protein	0,77

Anexo XI – Estudo da especificidade teórica dos *primers***lpp0845 - CsrA**gi|54295983:**947459 - 947668** *Legionella pneumophila* str.Paris

Primer F- TGATTTTGGACTCGGCGTATAGGT  
 Primer R – CAGATTCTTTTCTTGTTGTATGCG

**Primers validados****BLAST Primer F**

Score = 46.1 bits (23), Expect = 5e-07  
 Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23

Query	1	TGATTTTGGACTCGGCGTATAGGT	23
Sbjct	947478	TGATTTTGGACTCGGCGTATAGGT	947500 (NO GENE PRETENDIDO)

**Ligações na extremidade 3'até 50% do tamanho do *primer***

Não tem ligações

**BLAST Primer R**

Score = 50.1 bits (25), Expect = 4e-08  
 Identities = 25/25 (100%), Gaps = 0/25

Query	1	CAGATTCTTTTCTTGTTGTATGCG	25
Sbjct	947645	CAGATTCTTTTCTTGTTGTATGCG	947621 (NO GENE PRETENDIDO)

**Ligações na extremidade 3'até 50% do tamanho do *primer***

Não tem ligações

**Gene Runner primer F + primer F**

Dimeros (1), estrutura com ligações com valores positivos de energia livre

**Gene Runner primer R + primer R**

Hairpin (1) Dimeros (4) Internal (1), todas as estruturas formadas tinham ligações com valores positivos de energia livre

**Gene Runner primer F+ primer R**

Dimeros (1), estrutura com ligações com valores positivos de energia livre

**lpp2092** - SdeC protein, substrate of the Dot/Icm system>gi|54295983:**2372412 - 2377026** *Legionella pneumophila* str.Paris

Primer F – CCGGCTCTCACGGAATGTAG  
 Primer R - TTGCTTGACACCAACGATTTG

**Primers rejeitados****BLAST Primer F**

Score = 40.1 bits (20), Expect = 2e-05  
 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20  
 Query 1 CCGGCTCTCACGGAATGTAG 20  
 |||||  
 Sbjct **2375587** CCGGCTCTCACGGAATGTAG **2375606 (NO GENE PRETENDIDO)**

Score = 36.2 bits (18), Expect = 4e-04  
 Identities = **18/18** (100%), Gaps = 0/18  
 Query 1 CCGGCTCTCACGGAATGT 18  
 |||||  
 Sbjct **2384477** CCGGCTCTCACGGAATGT **2384494 (FORA DO GENE PRETENDIDO)**

**Ligações na extremidade 3'até 50% do tamanho do primer**

Score = 20.3 bits (10), Expect = 21  
 Identities = **10/10** (100%), Gaps = 0/10  
 Strand=Plus/Plus  
 Query 11 CGGAATGTAG 20  
 |||||  
 Sbjct **1155886** CGGAATGTAG **1155895**

Score = 20.3 bits (10), Expect = 21  
 Identities = **10/10** (100%), Gaps = 0/10  
 Strand=Plus/Minus  
 Query 11 CGGAATGTAG 20  
 |||||  
 Sbjct **3363594** CGGAATGTAG **3363585**

**BLAST Primer R**

Score = 42.1 bits (21), Expect = 7e-06  
 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)  
 Strand=Plus/Minus  
 Query 1 TTGCTTGACACCAACGATTTG 21  
 |||||  
 Sbjct **2375736** TTGCTTGACACCAACGATTTG **2375716 (NO GENE PRETENDIDO)**

**Ligações na extremidade 3'até 50% do tamanho do primer**

Score = 26.3 bits (13), Expect = 0.39  
 Identities = 19/21 (90%), Gaps = 0/21  
 Query 1 TTGCTTGACACCAACGATTTG 21  
 |||||  
 Sbjct **2384626** TTGCTTGACACCTACAATTTG **2384606**

Score = 22.3 bits (11), Expect = 6.1  
 Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11  
 Query 11 CCAACGATTTG 21  
 |||||  
 Sbjct **1844933** CCAACGATTTG **1844943**



## Anexo XII – Resultados da expressão génica relativa por PCR em tempo real

### A – Resultados da estirpe ST1 (*LpP*)

Amostra teste - ST1 (*LpP*) na fase estacionária da cultura líquida

Amostra calibradora - ST1 (*LpP*) na fase exponencial da cultura líquida

Genes	845	972	1315	1316	1340	1612b	1900	94	1330	2607	1170
<b>Expressão relativa do ARNm</b>	-1,12	13,00	-1,56	1,62	30,61	-1,01	3,57	-3,23	-1,10	1,18	1,86
	1,04	13,18	-1,15	2,64	32,36	-1,22	3,51	-3,03	-1,10	1,12	1,96
	-2,13	10,34	-1,25	1,33	51,05	-1,06	4,84	-9,09	-1,23	1,42	1,82
	-3,23	13,93	-1,35	1,89	30,45	-1,79	5,09	-4,76	-1,19	1,15	1,77
	-2,70	46,21	-2,38	1,90	20,05	-2,04	6,22	-8,33	-1,82	1,01	2,25
	-3,70	39,95	-2,44	1,45	48,33	-1,30	6,40	-9,09	-2,44	1,05	2,24
Média	<b>-1,97</b>	<b>22,77</b>	<b>-1,69</b>	<b>1,81</b>	<b>35,48</b>	<b>-1,40</b>	<b>4,94</b>	<b>-6,26</b>	<b>-1,48</b>	<b>1,16</b>	<b>1,98</b>
Desvio padrão	<b>1,73</b>	<b>15,90</b>	<b>0,58</b>	<b>0,47</b>	<b>11,87</b>	<b>0,42</b>	<b>1,24</b>	<b>2,91</b>	<b>0,54</b>	<b>0,14</b>	<b>0,21</b>

**Amostra teste – ST1 (*LpP*) após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac**  
**Amostra calibradora – ST1 (*LpP*) na fase estacionária da cultura líquida**

Genes	845	972	1315	1316	1340	1612b	1900	94	1330	2607	1170
<b>Expressão relativa do ARNm</b>	15,60	-3,85	3,53	5,90	-1,47	18,00	-1,12	26,9	37,5	140,1	1,12
	30,00	-3,13	3,19	6,10	-3,85	18,70	-1,54	23,3	35,84	121,37	1,14
	16,10	-3,45	4,25	2,99	-2,50	16,55	-1,10	31,11	39,92	221,18	1,06
	24,09	-2,44	4,96	3,41	-1,49	18,01	-1,23	20,83	34,53	247,37	1,05
	48,50	-5,26	8,17	8,69	-2,94	19,97	-3,03	38,05	44,02	317,37	1,05
	44,63	-6,25	8,69	8,17	-2,78	19,7	-2,44	32,7	45,25	313,03	1,07
Média	<b>29,82</b>	<b>-4,06</b>	<b>5,47</b>	<b>5,88</b>	<b>-2,50</b>	<b>18,49</b>	<b>-1,74</b>	<b>28,82</b>	<b>39,51</b>	<b>226,73</b>	<b>1,12</b>
Desvio padrão	<b>14,08</b>	<b>1,43</b>	<b>2,38</b>	<b>2,35</b>	<b>0,91</b>	<b>1,26</b>	<b>0,81</b>	<b>6,38</b>	<b>4,38</b>	<b>83,33</b>	<b>1,14</b>

**Amostra teste - ST1 (*LpP*) após 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac**  
**Amostra calibradora - ST1 (*LpP*) após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac**

Genes	845	972	1315	1316	1340	1612b	1900	94	1330	2607	1170
<b>Expressão relativa do ARNm</b>	2,40	-2,38	1,60	2,10	-1,16	2,60	1,30	1,60	-1,18	2,3	0,91
	2,60	-1,75	1,20	1,45	-1,45	3,00	2,20	2,10	-1,10	2,5	1,20
	1,90	-6,67	1,25	1,01	-1,15	2,10	1,50	1,01	-1,06	1,90	1,30
	1,90	-5,26	1,11	1,09	-1,28	1,80	1,60	1,02	-1,43	1,70	1,70
	2,50	-4,35	1,10	1,10	-1,12	1,90	2,30	1,40	-1,11	1,03	1,40
	1,80	-3,45	1,00	1,20	-1,14	2,01	2,02	1,60	-1,15	1,02	0,91
Média	<b>2,18</b>	<b>-3,98</b>	<b>1,21</b>	<b>1,21</b>	<b>-1,22</b>	<b>2,26</b>	<b>1,82</b>	<b>1,45</b>	<b>-1,17</b>	<b>1,73</b>	<b>1,23</b>
Desvio Padrão	<b>0,35</b>	<b>1,83</b>	<b>0,21</b>	<b>0,49</b>	<b>0,13</b>	<b>1,03</b>	<b>0,41</b>	<b>0,42</b>	<b>0,13</b>	<b>0,63</b>	<b>0,31</b>

**B – Resultados da estirpe ST100 (E18)**

**Amostra teste - ST100 (E18) na fase estacionária da cultura líquida**  
**Amostra calibradora - ST100 (E18) na fase exponencial da cultura líquida**

<b>Genes</b>	<b>845</b>	<b>972</b>	<b>1315</b>	<b>1316</b>	<b>1340</b>	<b>1612b</b>	<b>1900</b>
<b>Expressão relativa do ARNm</b>	1,00	140,07	6,36	2,44	130,61	5,54	17,14
	1,24	141,04	7,00	2,14	132,36	2,71	6,67
	1,87	240,52	17,72	1,71	81,05	4,20	29,06
	2,02	225,97	14,42	1,19	70,45	4,75	17,72
	1,15	109,14	8,21	1,81	60,05	2,13	12,71
	1,02	107,63	7,01	1,40	108,33	2,79	12,55
<b>Média</b>	<b>1,38</b>	<b>160,73</b>	<b>10,12</b>	<b>1,78</b>	<b>97,14</b>	<b>3,69</b>	<b>15,98</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,45</b>	<b>58,17</b>	<b>4,76</b>	<b>0,46</b>	<b>31,09</b>	<b>1,34</b>	<b>7,54</b>

**Amostra teste – ST100 (E18) após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac**  
**Amostra calibradora – ST100 (E18) na fase estacionária da cultura líquida**

<b>Genes</b>	<b>845</b>	<b>972</b>	<b>1315</b>	<b>1316</b>	<b>1340</b>	<b>1612b</b>	<b>1900</b>
<b>Expressão relativa do ARNm</b>	3,62	-20,00	-1,50	-1,06	-3,85	1,87	-1,15
	2,34	-14,30	-1,60	-1,27	-3,57	1,21	-1,33
	4,73	-50,0	-3,01	-2,04	-7,69	1,05	-2,04
	4,95	-50,0	-1,40	-2,63	-6,25	1,31	-2,00
	8,53	-25,0	-1,30	-1,89	-3,03	1,34	-1,69
	6,07	-25,0	-1,20	-2,22	-2,22	1,24	-1,59
<b>Média</b>	<b>5,04</b>	<b>-30,72</b>	<b>-1,67</b>	<b>-1,85</b>	<b>-4,44</b>	<b>1,31</b>	<b>-1,63</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>2,13</b>	<b>15,45</b>	<b>0,67</b>	<b>0,59</b>	<b>2,09</b>	<b>0,31</b>	<b>0,36</b>

**Amostra teste - ST100 (E18) após 2º ciclo de co-cultura Lp-Ac**  
**Amostra calibradora - ST100 (E18) após 1º ciclo de co-cultura Lp-Ac**

<b>Genes</b>	<b>845</b>	<b>972</b>	<b>1315</b>	<b>1316</b>	<b>1340</b>	<b>1612b</b>	<b>1900</b>
<b>Expressão relativa do ARNm</b>	-1,33	1,00	1,63	-1,43	-1,01	-1,45	-2,00
	-1,67	1,39	2,17	-1,28	-1,06	-1,10	-1,56
	-4,00	1,54	1,78	-2,86	-1,47	-3,03	-3,03
	-3,33	1,51	1,29	-2,00	-1,15	-3,45	-2,04
	-3,03	1,33	1,55	-1,79	-0,99	-1,49	-2,04
	-2,86	1,15	1,11	-1,82	-1,03	-1,39	-1,72
<b>Média</b>	<b>-2,70</b>	<b>1,32</b>	<b>1,59</b>	<b>-1,86</b>	<b>-1,12</b>	<b>-1,98</b>	<b>-2,07</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>1,02</b>	<b>0,21</b>	<b>0,37</b>	<b>0,56</b>	<b>0,18</b>	<b>0,99</b>	<b>0,51</b>